

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

---

## ETUDES SUR LA MICROBIOLOGIE DU SOL

### I. SUR LA MÉTHODE

par M. S. WINOGRADSKY.

*(Travail du laboratoire de Microbiologie agricole  
de l'Institut Pasteur, à Brie-Comte-Robert.)*

En abordant des études sur la microbiologie du sol, on est obligé de commencer par une définition, de rappeler le sujet principal de cette branche de la microbiologie, qui est l'étude des microbes du sol et de leur activité *au sein de ce milieu*, leur milieu naturel. Or, la microbiologie agricole actuelle ne dispose que de données se rapportant à certains microbes *isolés du sol* et étudiées *en dehors* de ce milieu, et elle ne possède aucune méthode spéciale pour suivre leur activité dans les conditions complexes de leur vie normale.

Si, tout de même, cette science a acquis certaines données importantes sur les grands phénomènes généraux, dont le sol est le siège, et sur leurs agents microbiens, ces résultats ne sont dus qu'à la collaboration de la chimie agronomique ou de la biochimie, dont les études ont précédé les recherches de microbiologie pure ou marché de pair avec elles.

Empressons-nous de remarquer que cette critique n'est guère de nature à déprécier les recherches exécutées au cours d'une quarantaine d'années dans ce domaine. Les débuts de la jeune branche, et même son développement durant au moins la première vingtaine d'années, ne pouvaient être que ce qu'ils ont été. Ce qui importait alors avant tout, c'était la connaissance des formes microbiennes et de leur physiologie, et il n'y avait que la méthode classique de la microbiologie, avec son principe obligatoire de culture pure, qui rendait les espèces microbiennes accessibles à une étude approfondie et mettait l'observateur à l'abri des erreurs qui le guettaient à chaque pas. S'il y a quelques réserves à formuler, ce n'est que concernant la seconde moitié de la longue période de travail que nous nous proposons maintenant de passer sommairement en revue.

### Revue critique des problèmes et des méthodes.

Loin de nous l'intention de tenter un aperçu historique, même le plus abrégé, du développement de la microbiologie du sol. Tout ce qui nous intéresse, c'est de suivre les grandes lignes des recherches sur les problèmes les plus importants et principalement au point de vue des méthodes, cela pour juger si ces méthodes suffisent pour élucider les questions posées, ou bien s'il serait temps de s'armer de méthodes plus efficaces.

Nous supposons ces problèmes connus, ainsi que les principaux résultats, et puisqu'on les trouve depuis des années dans tous les traités de microbiologie agricole, nous pouvons nous dispenser de citer la littérature qui s'y rapporte et traiter ce travail ancien comme un travail collectif.

Comme nous venons de l'indiquer sommairement, deux lignes de recherches se dégagent nettement en considérant ce travail. D'un côté, celle de la microbiologie *sensu stricto*, soit l'étude des espèces microbiennes qu'on isolait du sol; de l'autre, l'étude des processus chimiques ayant lieu dans le sol même, sous l'influence des microbes, soit la biochimie du sol. Tout en marchant souvent de pair, les deux lignes ne se confondaient pas, étant différentes par leurs méthodes respec-



tives. Ni l'une, ni l'autre ne s'appuyait sur un cycle expérimental complet. La première, tout en étudiant les microbes dans des conditions déterminées et très variées de culture artificielle, ne suivait que mentalement, en quelque sorte, leur activité dans leur milieu naturel. La seconde ne s'occupait que de l'effet chimique final dans le sol, sans jamais tenir l'agent qu'elle supposait être celui ou ceux que lui indiquait la microbiologie. Par conséquent, les résultats acquis n'ont pu naître que du rapprochement de ces deux catégories de données; ils ne s'appuient pas sur des expériences directes; ils ne sont, en somme, que des conclusions hypothétiques dont le degré de démonstration est très inégal.

Il n'est pas à nier tout de même que cette collaboration, au moyen de méthodes qui se complétaient mutuellement jusqu'à un certain point, a produit de beaux fruits, en dégagant du bloc confus des actions microbiennes dans le sol plusieurs grands phénomènes généraux, qui figurent depuis au programme de la microbiologie du sol comme problèmes centraux.

NITRIFICATION. — La collaboration a débuté, comme on le sait, du côté microbiologique, par les recherches sur la nitrification tant étudiée par les chimistes agronomes, attribuée déjà à une cause biochimique, mais dont les agents microbiens restaient encore à trouver. La microbiologie les a isolés du sol; elle a reproduit en culture pure le processus; elle a complété les notions acquises en chimie agronomique, en démontrant que l'oxydation de l'ammoniaque est un processus double, composé de deux processus autonomes, — nitritation et nitratisation, — chacun présidé par un agent spécialisé, bien déterminé; que la *nitrification de l'azote organique* des chimistes n'est qu'un effet final, composé de plusieurs actions qui se superposent; que la décomposition de la matière organique, ni même la production de l'ammoniaque ou *ammonification*, ne sont du domaine des microbes nitrificateurs; que ces microbes sont des organismes à nutrition purement minérale, dépourvus d'action sur les matières organiques et sont même paralysés par de faibles doses de ces matières.

Ces microbes, isolés sur milieux de laboratoire, devaient-ils

être identifiés aux agents nitrificateurs fonctionnant dans le sol?

Malgré le fait que quelques-uns de leurs caractères, et non de moindre importance, ont été inattendus pour les chimistes agronomes, des doutes sur ce sujet ne sont venus à personne. C'est que leurs fonctions si spéciales, leurs caractères si tranchés, leur assignaient une place bien à part entre les microbes; de plus, d'autres organismes de la même fonction ne se laissaient pas découvrir; enfin, les différences qu'on constatait entre culture pure et sol, soit absence de la phase nitreuse dans ce dernier et tolérance qu'on croyait plus grande envers la matière organique, s'expliquaient facilement par les différences des conditions chimiques et biologiques des milieux. La réponse à la question d'identité a été unanimement affirmative et elle est restée telle.

Ce début était bien de nature à éveiller de larges espérances sur le rôle de la microbiologie pure dans l'étude des processus du sol.

Malheureusement, des cas de cette clarté et de cette simplicité ne se sont plus présentés dans la suite des recherches.

AMMONIFICATION. — A commencer par cet autre grand processus général qui est apparu, à la suite des recherches sur la nitrification, comme un processus autonome : l'ammonification. On n'a eu aucune difficulté à trouver des ferments ammonifiants. Leur nombre était grand dans tous les groupes de microbes. Il y avait plutôt embarras de choix. Mais le fait seul de cette multiplicité ne suffit nullement pour répondre à la question de savoir lesquels de ces ferments sont actifs dans les conditions d'un sol donné. Ce chapitre manque donc totale-ment de précision.

FIXATION DE L'AZOTE. — De tous ces grands phénomènes, c'est la fixation qui a éveillé peut-être le plus d'intérêt et d'efforts. Mettons tout de suite hors de cause la fixation symbiotique, où les relations entre plante et microbe permettaient un cycle complet d'expériences, au même titre que dans des cas de parasitisme. Occupons-nous seulement des fixateurs qui sont censés fixer l'azote gazeux aux dépens des matières hydrocarbonées de la terre.



Après la découverte des deux premiers fixateurs, le *Clostridium Pastorianum* et l'*Azotobacter*, on a réussi à provoquer la fixation de l'azote dans les cultures pures d'un assez grand nombre d'espèces, dont une partie ne pouvait même être considérée comme des microbes du sol (par exemple le bacille pyrocyanique, le *Micrococcus prodigiosus*, quelques bactéries du lait, etc.), dont l'habitat est toujours un milieu très riche en matière azotée s'en sont montrés capables, à condition d'être soumis, comme tous les autres, à l'inanition azotée en présence d'un excès de matière hydrocarbonée. Les espèces capables de supporter ce régime pendant une période assez longue montraient généralement un gain d'azote, très variable et peu important, mais dosable.

Ces expériences, destinées évidemment à élargir nos connaissances sur cette fonction intéressante, ont bien réussi à effacer les idées qu'on s'en faisait comme d'une fonction spéciale, propre à certains microbes du sol. Elles les ont remplacées — sans le vouloir — par une probabilité qui s'impose presque : c'est qu'il serait possible de provoquer, au moyen de ce régime sévère, une certaine aptitude fixatrice chez une espèce quelconque, aptitude qui était aussi inutile qu'inexistante dans les conditions de vie normale. Trop nombreux sont les cas en microbiologie où, par de nouvelles conditions d'existence, on peut créer à volonté des aptitudes nouvelles, pour que nous ayons besoin de citer des exemples à l'appui de cette assertion. Et si c'est ainsi — ce qui ne paraît guère douteux — la distinction s'impose entre *fixateurs artificiels* ou de laboratoire, et *fixateurs naturels* ou du sol.

Ces soupçons éveillés, il est difficile de ne pas revenir sur les fixateurs de la première heure, et de ne pas se demander dans quelle catégorie il faudrait les compter : exercent-ils cette fonction dans le sol, ou seulement au laboratoire, sous le régime tout spécial qu'on leur fait ?

L'opinion que le *Clostridium* et l'*Azotobacter* sont des fixateurs vrais s'est bien enracinée en microbiologie depuis plus d'une vingtaine d'années. L'intérêt éveillé par le fixateur aérobic, l'*Azotobacter*, a provoqué une immense littérature. On a accumulé un grand nombre d'observations, qui mettent bien en lumière son aptitude fixatrice et les conditions dans

lesquelles elle s'exerce. On a constaté qu'une terre d'expérience qui ne fixe pas ou fixe mal l'azote, additionnée de mannite ou de glucose, ne donne pas de culture dans le milieu conventionnel; que le taux de fixation, extrêmement variable en général, est à peu près du même ordre, quand il est au maximum, dans la terre d'expérience et en culture pure; qu'une terre acide ne donne pas de culture, ce qui correspond au fait que l'*Azotobacter* est incapable de vivre dans un milieu dont le  $pH$  est inférieur à 6,0; enfin, que le pouvoir d'une terre de décomposer la mannite est en rapport avec son pouvoir fixateur. Tous ces faits rendent bien probable que c'est l'*Azotobacter* qui fixe l'azote dans une terre fraîche additionnée de mannite, comme il le fait dans la solution de Beijerinck ou sur la gélose mannitée. Seulement, même dans cette terre d'expérience, sucrée ou mannitée, on ne l'a jamais vu pulluler, et la conclusion reste une vue d'esprit, probable soit, mais non démontré *ad oculos*. Ce reproche ne touche pas seulement à la méthode, mais il veut dire que bien des modalités de ce processus restent inconnues. Surtout quand on songe que, de la terre sucrée ou mannitée à la terre normale, il y a encore une grande étape à franchir: il y a la question de savoir aux dépens de quelles substances se fait la fixation lente, constatée par les chimistes-agronomes dans les champs, et si ce phénomène d'une allure toute différente est produit par les mêmes organismes. Des réponses plus ou moins plausibles se présentent, mais toutes basées sur des expériences dans des conditions très éloignées des conditions naturelles, et qui ne peuvent avoir, par conséquent, qu'un caractère hypothétique. En résumé, ce problème attend, comme les autres, une nouvelle méthode pour être approché de plus près.

DÉCOMPOSITION DES MATIÈRES ORGANIQUES. — Ce sont, comme on le sait, les trois phénomènes du cycle de l'azote : *ammonification*, *nitrification*, *fixation*, qui ont attiré le plus d'efforts dans la Science du sol. Voyons ce qu'il en est d'un quatrième, touchant principalement à la matière hydrocarbonée. Au point de vue de la circulation de la matière, son importance n'est sûrement pas moindre, si on considère la multiplicité des processus, la masse des substances qui y passent, enfin, le nombre



des espèces microbiennes qui y prennent part. Nous entendons la minéralisation de toutes les substances organiques, dont le sol est le dépotoir général.

On connaît les très nombreuses études sur la fermentation ou dégradation des substances organiques attaquables par les microbes. Ces études, en montrant comment ces substances se dédoublent, quels produits en résultent, quels micro-organismes y prennent part, nous ont fourni un grand nombre d'indications, qui sont certainement applicables à l'étude de la dégradation des matières dans le sol. Seulement, cette application demande des études spéciales avec le milieu sol, qui n'ont pas été encore exécutées, faute de méthode. Car est-il besoin de dire que les conditions y sont toutes différentes que dans une expérience de fermentation? Il est évident qu'un mélange de débris minéraux avec de la matière colloïdale — minérale et organique — très pauvre en substance organique, peuplé par une variété de germes différents, ne peut être comparé que de loin à un milieu nutritif riche, liquide surtout, en état de fermentation sous l'action d'un microbe inoculé à l'état de pureté. Si donc le dédoublement des substances est déterminé essentiellement par leur structure chimique, comme dans les expériences de fermentation, l'allure des processus et leurs agents microbiens pourront en être différents, car ce ne sera que le plus spécialisé qui pourra s'emparer de la matière énergétique dans la lutte qui se déclenchera autour d'elle. A la place du microbe choisi par l'expérimentateur, le jeu des forces microbiennes y mettra l'espèce, ou le groupe, le plus favorisé dans les conditions données.

Ici, comme ailleurs, nous voyons les mêmes deux groupes de notions acquises par deux procédés différents, qui se complètent mutuellement, sans arriver au degré de précision désirable : d'un côté, la microbiologie a isolé du sol un grand nombre d'espèces capables de dégrader les corps organiques; d'un autre, la biochimie a constaté que cette décomposition a réellement lieu dans le sol, et elle en a étudié, quoique sommairement, la marche.

De nouveau, nous voyons la microbiologie tenir les agents microbiens, mais s'arrêter devant le problème de leur activité dans le sol; tandis que la biochimie, en suivant cette activité,

ne nous fournit aucune information sur les organismes qui la développent.

ÉRÉMACAUSIS. — Passons sur le processus d'humification des substances organiques qui n'a pas beaucoup avancé, étant loin d'être élucidé au point de vue chimique, autant que microbiologique.

Arrivons tout de suite à la combustion lente de la matière humique formée, processus tant étudié par les chimistes-agronomes, désigné par le terme *érémacausis* et mesuré le plus souvent par le dégagement d'acide carbonique, qui a lieu dans tous les sols. Processus sans aucun doute microbien, il méritait plus d'attention de la part des microbiologistes agricoles : les agents qui l'accomplissent restent encore totalement inconnus. Cependant, étudier les *microbes humivores*, qui doivent être présents dans tous les sols, est un problème qui a sa place marquée dans le programme d'études de notre branche. De plus, il ne présente pas de difficultés sérieuses. S'il n'a pas fait de progrès, cela devrait être attribué à certains procédés et formules, qui ont trop dominé la méthode, ou généralement à son insuffisance.

Bornons-nous aux phénomènes généraux que nous venons de passer en revue, sans insister sur les phénomènes importants, mais moins généraux, comme la dénitrification, la fermentation de l'urée, l'oxydation du soufre, d'autres encore de moindre importance, qui sont à l'ordre du jour de la microbiologie, en même temps que de la biochimie du sol. Tournons-nous du côté de la microbiologie pure, pour examiner de plus près quelques traits importants de son procédé actuel. Nous résumerons ensuite l'état de la question de la microflore du sol, qui est entièrement de son domaine.

CULTURE ÉLECTIVE. — On sait que c'est le principe de la culture élective qui a permis de découvrir et d'isoler les microbes de la nitrification. Depuis, on l'a appliqué à tous les cas où il s'agissait de trouver un microbe à fonction déterminée. Lorsqu'on l'appliquait aux organismes du sol, il consistait à introduire un peu de terre dans une solution, composée de



manière qu'elle ne soit favorable qu'à l'exercice d'une fonction bien spéciale, en même temps que nettement défavorable aux organismes étrangers à cette fonction. Quand celle-ci s'est bien déclarée, on inocule et réinocule plusieurs fois la même solution, jusqu'à ce que la culture suivie dans le milieu liquide conduise à l'élimination de la majeure partie des espèces étrangères et à la prédominance de l'espèce intéressante. Ce n'est qu'alors que l'on procède à l'isolement définitif au moyen d'un milieu solide approprié. Une fois isolé, le microbe est maintenu indéfiniment en culture pure dans la collection du laboratoire, pour servir aux expériences ultérieures.

C'est exactement le même procédé qui a reçu dans la suite de M. Beijerinck le nom d'*expériences d'accumulation* (*Anhäufungsversuche*), mais le nouveau nom n'y a rien changé.

La méthode a fait ses preuves et elle a bien servi au développement de nos connaissances. Mais chaque méthode a son temps. Si, à ses débuts, on ne voyait pas les réserves à faire quant à son application aux organismes aérobies du sol, on les voit assez nettement à l'heure qu'il est. Elles touchent surtout aux expériences avec les nitrificateurs et les fixateurs.

Tous ceux qui ont fait des expériences sur la nitrification ont été frappés par la lenteur extrême, souvent déconcertante, avec laquelle la première culture inoculée avec de la terre se met en train : on attend de longues semaines avant de constater les premières traces de nitrite. La quantité de terre introduite ne favorise nullement l'éclosion du processus. Mais cette première culture de la lignée de laboratoire une fois nitrifiée, la moindre gouttelette suffit à provoquer le processus dans les cultures en séries; et cela de plus en plus facilement jusqu'à ce que les expériences prennent une allure régulière et vive. Evidemment, le transport des microbes spécifiques dans des conditions inaccoutumées exerce sur eux une influence nettement déprimante, et c'est là la cause de cette « incubation » démesurément longue. Cependant, la pullulation accompagnée du processus finit par reprendre et même par redevenir intense malgré le maintien de ces mêmes conditions : il y a donc adaptation, formation d'une nouvelle race qui prospère dans le milieu liquide. Autrement dit, cette incubation est en réalité un *processus de sélection* qui aboutit à la production d'une

souche aérotaxique et mobile, mieux adaptée à l'existence aquatique. Aussi, l'observation que les souches de la *nitrosomonade* les plus énergiques se distinguent par leur mobilité, tandis que les moins actives ne poussent que sous forme de colonies (ou zooglées) compactes, a été bien mise en relief il y a plus d'une trentaine d'années.

Essentiellement, les mêmes faits ont lieu dans les « cultures d'accumulation » des grands cocci autochtones du sol qu'on nomme *Azotobacter*. Les lenteurs ne sont pas si grandes, grâce à l'allure tout autre des organismes hétérotropes vis-à-vis des autotropes. Et pourtant, c'est un fait non moins banal que les premières cultures inoculées avec de la terre échouent souvent, et, si on en prépare un lot, la marche en est très différente. Tantôt le voile brun couvre toute la surface, tantôt il ne s'y forme qu'un anneau, tantôt une fermentation se déclare, et les *Azotobacters* ne paraissent pas, ou très tardivement. On a imaginé d'ajuster des bandes de papier émergeant du liquide pour donner un soutien à celles des cellules qui réussissent à monter et à s'y fixer. Il est plus que probable qu'une sélection doit s'opérer dans ces conditions déprimantes, et que ce ne sont que les individus les plus mobiles qui arrivent à pulluler dans la couche liquide. Ce qui en résulte dans ce cas également, c'est la production de cellules qui diffèrent en certains points des cellules du sol, et cela dès la culture du début, issue de la terre. Ces nouvelles propriétés sont ensuite fixées par des passages successifs dans le même milieu, et finalement une souche de laboratoire est créée, et c'est elle qu'on utilise pour les expériences de laboratoire pendant de longues années.

Cette critique ne vise guère à nier l'intérêt des expériences exécutées sur des variétés de laboratoires, issues des espèces résidant dans le sol. Ces expériences, au contraire, sont importantes, car elles nous donnent une idée plus ou moins rapprochée des propriétés de l'espèce originaire; c'est grâce à elles que sa différenciation nous sera facilitée au sein du sol, quand nous en posséderons les moyens. Seulement, il importe de ne pas identifier sans réserves la *plante de culture*, qu'est devenue la race de laboratoire, avec son ancêtre sauvage. Elle pourrait bien acquérir des propriétés nouvelles par la culture,



ou inversement, perdre certains caractères de l'espèce du sol.

Notre critique ne vise qu'à la nécessité de modifier le procédé classique, tout en maintenant et en perfectionnant le principe, toujours fructueux, de la culture élective; de le modifier notamment en vue de rapprocher les conditions de culture, autant que possible, de celles du milieu naturel, pour faciliter la reprise et écarter les chances d'une sélection.

**MICROFLORE.** — Il ne nous reste qu'à passer brièvement en revue les études sur la microflore du sol, ou sur ce qu'on désigne de ce nom.

Particulièrement nombreuses ont été les études sur la numération des germes, faites par la méthode des plaques. On est unanime maintenant à reconnaître que ces numérations donnent une idée inexacte du nombre réel des germes, car ce n'est qu'une minorité qui se développe sur les quelques milieux, à base de gélatine ou de gélose, qu'on leur offre. Cette minorité est, de plus, inactive dans le *sol normal* que nous définirons tout à l'heure. La quantité de microbes dans le sol (nous entendons, la quantité réelle et totale) reste donc inconnue, et elle le sera jusqu'à ce que l'étude microscopique directe nous donne une image visuelle du peuplement du sol; car les espèces microbiennes qu'il contient sont trop profondément différentes par leurs fonctions, pour que l'on puisse compter sur l'apparition de leurs colonies sur un milieu-standard, et même sur tout un lot de milieux imaginés pour ce but.

Inconnue au point de vue quantité, la microflore ne l'est pas plus comme qualité. Un grand nombre d'espèces en ont été isolées par les méthodes conventionnelles. Ce sont, pour la plupart, de vrais bacilles sporogènes, et de là vient l'opinion, qui date des premières recherches et qui est devenue classique, à savoir que la microflore du sol est composée, sinon exclusivement, du moins principalement de bacilles. Cette opinion est due au fait que les bacilles sont particulièrement aptes à la culture dans les milieux bactériologiques. Ils s'imposaient à l'attention, tandis que les autres espèces, moins dociles ou mêmes réfractaires, échappaient à l'observation.

En considérant les travaux dans cette direction, la critique s'impose qu'ils ont été exécutés au hasard des recherches, sans

idées directrices bien arrêtées. En effet, avant d'étudier la microflore du sol, une définition est indispensable sur le vrai sens de cette expression. Le sol, dépotoir de tous les déchets, peut évidemment contenir temporairement et par endroits toute sorte de germes, sauf les parasites obligatoires. Il serait donc inutile de parler d'une microflore spéciale : presque toutes les espèces connues lui appartiendraient, celles qui y sont enfouies avec les cadavres en voie de décomposition, au même titre que les nitrificateurs, les fixateurs, les humivores et d'autres microbes autochtones (1). Par conséquent, si ce terme doit avoir un sens œcologique, il doit être limité aux microbes spécialement adaptés à la vie dans le milieu sol; et puisque ce milieu est souvent souillé par place de matières très diverses qui lui sont étrangères et qui y subissent une décomposition, on doit compléter la définition en ajoutant au mot *sol* : *sol minéral biologiquement normal*. Ce qui veut dire qu'il ne contient pas de substances organiques en voie de fermentation, ou de dédoublement, mais déjà des substances dégradées et ramenées à cet état comparativement stable que présentent les substances qu'on s'entend à désigner par le terme de *humiques*. Ce n'est que dans ce sol *normal* qu'on trouvera la vraie microflore, et ce n'est qu'un examen microscopique direct qui pourra servir de base à l'étude de ces espèces *humivores*.

Les notions sur la microflore étant si incomplètes, l'élaboration d'une méthode d'analyse microbiologique du sol se fera encore attendre. On comprend maintenant toute la complexité de ce problème qui paraissait si simple au début de la microbiologie. Elle est due, nous le répétons, à la variété des fonctions des microbes du sol, dont on se rend compte actuellement, et c'est là qu'il faut chercher la raison de l'impuissance des méthodes courantes, trop conventionnelles, et ramenées à quelques formules, insuffisantes à l'étude des phénomènes naturels.

PÉRIODE RÉCENTE. — La conviction de l'insuffisance des méthodes courantes ne nous est pas personnelle. Des critiques dans le

(1) Sur la microflore autochtone de la terre arable. Voir C. R., 178, séance du 7 avril 1924.



même sens ont été publiées incidemment dans des mémoires originaux, ainsi que dans des monographies et traités. Il est impossible de les mentionner toutes. Quelques exemples suffiront pour montrer que nous ne sommes pas isolés sous ce point.

En cherchant une date, on trouverait que des notes de désappointement, de fatigue, se font entendre déjà depuis 1909, passée la première vingtaine d'années de recherches actives. C'est, par exemple, vers cette époque qu'on trouve un article critique de M. Hugo Fischer, intitulé : « Possédons-nous une méthode efficace d'étude bactériologique du sol ? » (1), lequel, passant en revue les méthodes proposées en Allemagne, conclut à la négative.

Sir J. Russel, directeur de la Station expérimentale de Rothamstead, commence le chapitre de sa monographie remarquable consacrée à la population micro-organique du sol (2), *les conditions du sol et la croissance des plantes*, par l'aveu que « nous ne savons que très peu de choses sur ces organismes ». « Ordinairement, poursuit-il, ces micro-organismes sont isolés par quelque méthode de culture, et on étudie leur effet physiologique dans une solution arbitrairement composée à cet usage : il arrive que les résultats ainsi obtenus sont immédiatement appliqués au sol. Cette méthode est défectueuse pour deux raisons » : l'une touche à la variabilité des espèces, l'autre à la possibilité d'une vie latente, d'un état inactif de ces espèces dans le sol. « On n'est donc jamais sûr d'affirmer sans preuves qu'un micro-organisme, découvert par des méthodes de culture, est actif dans le sol. »

Ces mêmes idées ont été développées indépendamment par M. J. Conn, bactériologiste américain, dans un article « *sur les preuves de l'activité microbienne dans les transformations chimiques du sol* » (3) : « Est-il définitivement prouvé, dit-il, que certain microbe soit la cause d'une action biologique déterminée dans le sol ? La question serait bien actuelle en vue des assertions souvent trouvées dans la littérature que cer-

(1) *Centralblatt f. Bakter.*, II, 23, 1909.

(2) Quatrième édition anglaise, 1921. Traduction française parue récemment chez Ernest Flammarion.

3) *Science*, 66, 1917.

taines bactéries ou groupes de bactéries sont responsables de certains processus chimiques, quoique une preuve complète du rapport de cause à effet n'ait jamais été obtenue ». « Les expériences de laboratoire ne montrent que ce que les microbes font dans les conditions du laboratoire, mais non ce qu'ils font dans le sol », car les cultures pures n'y existent pas. Pour y remédier, M. Conn rappelle les quatre postulats bien connus de M. Koch, dont le principal, soit l'inoculation expérimentale du milieu par la culture pure, manque dans le cas du sol, ce qui fait que le cycle expérimental obligatoire reste incomplet. Pour le compléter, il serait nécessaire d'inoculer une terre naturelle, non stérilisée; mais le procédé étant impossible, il n'y aurait qu'à employer un sol stérilisé. « La preuve fournie par cette expérience serait meilleure que l'inoculation dans un milieu de laboratoire, mais la nature peu satisfaisante de cette épreuve doit être pleinement reconnue. »

La culture dans la terre stérilisée à l'autoclave a été pratiquée avec succès par M. Chr. Barthel (1). C'est de terreau de jardin qu'il se servait. Il y a fait pulluler l'*Azotobacter*, le *B. radicicola*, deux microbes du lait, enfin le *Bac. mycoïdes*. Il a constaté au microscope leur présence dans une suspension très étendue, où il parvenait à les distinguer à la périphérie de la goutte, et il voyait les particules de terre déposées sur milieu gélosé s'entourer de leurs colonies. Le fait n'a rien d'étonnant, car le terreau autoclavé n'est qu'une masse imbibée d'un extrait, d'une sorte de bouillon, où la matière vivante très finement divisée a remplacé la viande, et si les quantités de matière ne sont pas comparables, les quantités d'eau ne le sont pas non plus, car le terreau employé ne contenait que 44 à 47 p. 100 d'humidité; après deux heures d'action à 120°, il a bien pu en résulter un bouillon assez concentré pour entretenir une certaine pullulation d'un grand nombre d'espèces microbiennes, surtout si elles n'y trouvaient pas de concurrents.

L'intérêt principal du travail de M. Barthel n'est pas dans ce fait positif, mais plutôt dans le fait négatif que voici : « Si on ensemence, dit-il, un micro-organisme quelconque dans de la

(1) C. R. de l'Acad. des Sciences de Suède, Institut Nobel, 5, n° 20, 1919.



terre non stérilisée, on n'y observe aucun développement. » Le fait est net et précis, et il nous démontre une fois de plus que la terre stérilisée n'est qu'un milieu artificiel quelconque : la culture dans ce milieu, chimiquement et surtout biologiquement si différent du milieu *sol*, ne peut guère avancer sa microbiologie, ni servir de base à une méthode nouvelle.

A ce sujet, nous ne pouvons pas partager l'opinion de M. Conn. Nous croyons plutôt qu'il n'y a rien à faire de ce côté.

Revenant aux travaux de ce savant, empressons-nous de reconnaître que nous lui devons un progrès méritoire, celui d'avoir insisté sur la nécessité de l'étude microscopique du sol et d'en avoir proposé une première méthode.

Après des études très étendues sur la microflore du sol (1), exécutées au moyen des méthodes ordinaires, il a été amené à la conclusion qu'il y a « nécessité de quelque méthode directe... qui pourrait être employée pour contrôler les méthodes de culture ». C'est la méthode microscopique décrite dans un mémoire « *sur l'étude microscopique des bactéries et champignons du sol* » (2). Nous en exposerons la technique dans le chapitre consacré à la microscopie du sol.

Quant à la portée de sa méthode, cet auteur croit qu'elle promet de bons résultats, à condition d'être employée en combinaison avec les cultures sur plaques, et « en faisant des recherches sur la flore du sol; les données microscopiques doivent être comparées avec les données obtenues par la méthode de culture ». D'autre part, « la faiblesse de la méthode réside dans le fait qu'il n'est pas possible d'isoler les organismes qu'on voit et qu'il n'y a pas moyen d'étudier leur activité ».

Autrement dit, il ne s'agit que d'une méthode micrographique qui n'aboutit à aucune expérimentation générale. Tout de même, elle lui a permis l'étude de deux questions intéressantes, à savoir : 1° la quantité générale des germes visibles au microscope; 2° les pullulations qui ont lieu dans le sol sous l'influence d'engrais azotés.

(1) Soil flora studies I-IV. N. Y., *Agr. Exp. Station, Technical bulletins*, nos 57, 58, 59, 1917.

(2) The microscopic studies of bacteri and fungi in soil. *Ibidem. Tech. bul.*, n° 64, 1918.

Les « numérations microscopiques » ont donné des chiffres qui sont de nature à enlever le dernier crédit à la méthode des plaques. Que celle-ci donne des chiffres bien inférieurs à la réalité, personne n'en doutait, mais des différences telles que 17 millions contre 175, 14 contre 340, 13 contre 214, 3 contre 133 et ainsi de suite, ont dépassé les prévisions. M. Conn démontre que ces écarts énormes sont dus au fait que la majorité des germes du sol se refuse à pulluler sur les milieux standard. En effet, si on inocule la terre stérilisée avec des germes connus qui pullulent bien sur gélatine et si on en fait ensuite des numérations parallèles, au microscope et par la méthode des plaques, les écarts entre les deux séries de chiffres se réduisent de beaucoup, et c'est tantôt la numération microscopique, tantôt celle des colonies qui donne les nombres les plus forts.

Quant aux espèces qui peuplent le sol, M. Conn y distingue deux grands groupes morphologiques : les « *spore formers* » et les « *non spore formers* ».

En provoquant par des engrais azotés des pullulations de germes, MM. Joffe et Conn ont constaté (1) que ce sont les bacilles sporogènes qui envahissent dans ce cas la terre. Il y a donc raison de penser, concluent-ils, que le rôle des bacilles sporogènes dans le sol n'est que celui de veiller au moment propice (*watchful waiting*). Ils s'emparent des particules de matière organique pour pulluler abondamment et passer ensuite à l'état de spores. Quand les circonstances leur fournissent de la matière organique avec l'eau nécessaire, les spores germent rapidement et provoquent les stades initiaux de la décomposition de cette matière, plus rapidement que les « non formant spores, lesquels doivent être considérés comme les organismes actifs dans les conditions ordinaires des champs ».

Cette conclusion, malgré sa forme un peu vague, est digne d'attention, comme une première tentative d'apprécier le rôle des différents groupes d'organismes dans le sol au moyen de l'étude microscopique.

Mais, en somme, la méthode de M. J. Conn, proposée en 1917,

(1) S. JOFFE et J. CONN, Factors influencing the action of spore-forming bacteria in soil, *l. c. Techn. bull.*, n° 97, 1923.



n'a attiré l'attention que comme une méthode de *microscopic count*, et encore est-elle restée d'un emploi rare.

Nous ne la retrouvons que dans un travail de M. Whittles (1), en combinaison avec une certaine méthode de vibration, destinée à désagréger les amas bactériens (*clumps*), paru en 1923. Cet auteur a constaté les mêmes écarts énormes entre les nombres fournis par les deux méthodes récentes, d'un côté, et l'ancienne, de l'autre. Le résultat lui a valu une critique de M. Thornton (2), de Rothamsted, qui a exprimé des doutes sur l'exactitude des *microscopic counts*. « Sans voir les préparations, remarque-t-il, il est impossible de dire si la difficulté, encore insurmontée jusqu'à présent, de distinguer les bactéries vivantes des bactéries mortes et des particules du sol a été vaincue. »

Il est bien probable que ce jugement est celui de la majorité, et ceci expliquerait le fait que la microscopie microbiologique du sol, dont M. J. Conn a proposé une première méthode, n'a éveillé que peu d'intérêt.

De notre revue des méthodes, deux conclusions se dégagent : l'une, que l'insuffisance des méthodes microbiologiques pour l'étude des ferments du sol a été reconnue indépendamment par plusieurs savants déjà depuis un certain temps, sous forme de remarques critiques, très justes, quoique non appuyées par une analyse complète de l'ensemble de la question ; l'autre, que ces idées ont exercé très peu d'influence sur le procédé en cours, qui est resté essentiellement le même jusqu'à ce jour, — et il est naturel de l'attribuer au fait qu'aucun nouveau procédé n'a encore été élaboré, qui aurait pu guider les chercheurs vers une voie nouvelle.

### La méthode directe (3).

Les principes de la méthode directe se laissent facilement déduire de notre aperçu.

(1) The determination of the number of bacteria in soil. *The Journal of Agricul. Sc.*, **13**, 1, 1923.

(2) On the vibration method, etc. *Ibidem*, **13**, 3, 1923.

(3) Sur la méthode directe dans l'étude microbiologique du sol. *C.R.*, **177**, séance du 19 novembre 1923.

Les méthodes de culture actuelles donnant une idée fausse de la population microbienne du sol, une méthode d'examen microscopique directe est indispensable, aussi sensible que celles qui sont employées pour l'étude de différents autres milieux à microbes.

La culture pure sur milieux conventionnels donnant une idée inexacte, en tout cas imprécise ou hypothétique, de la fonction des espèces microbiennes dans le milieu sol, il est nécessaire de la remplacer par la culture dans ce milieu même à l'état de nature, additionné s'il y a lieu de substances diverses selon les fonctions à étudier.

Les formules des milieux bactériologiques étant trop éloignées sous tant de rapports du milieu sol, il est nécessaire d'en introduire d'autres, reproduisant aussi exactement que possible les conditions de vie spéciales aux espèces ou groupes étudiés.

Conformément à ces trois postulats, nous traiterons de trois groupes de méthodes dans les trois paragraphes qui suivent et qui seront consacrés :

Le premier, à la microscopie microbiologique de la terre ;

Le deuxième, à la culture dans la terre naturelle ;

Le troisième, à la culture auxiliaire sur un milieu solide imitant le sol.

Nous résumerons en même temps quelques résultats importants que nous devons à la méthode, et qui servent de directives à nos recherches en train, dont la publication, comme nous l'espérons, ne se fera pas attendre longtemps.

## 1. La microscopie microbiologique du sol.

GÉNÉRALITÉS. — La microscopie de la terre comme habitat des microbes a été, on peut l'affirmer, bien négligée. Depuis l'avènement de la microbiologie, elle n'a jamais été pratiquée systématiquement, et il n'en existait aucune méthode. Les méthodes rudimentaires d'avant l'ère microbiologique ont été reconnues avec raison insuffisantes, mais la technique microscopique perfectionnée, qui date déjà d'une quarantaine d'années, n'a guère touché au sol. Il y a bien lieu de se demander pour quelle cause cette source d'information est restée si longtemps

fermée? Nous croyons que ce ne sont pas tant les difficultés techniques, qui en sont la cause, que la conviction des microbiologistes qu'il n'y a rien à chercher dans cette direction, ces méthodes de cultures étant considérées par habitude comme insuffisamment sûres. Et quant à employer les méthodes de préparation usitées pour différencier les microbes, soit les colorants basiques, on les trouvait inapplicables dans le cas, car les colloïdes du sol retiennent très avidement ces colorants, et

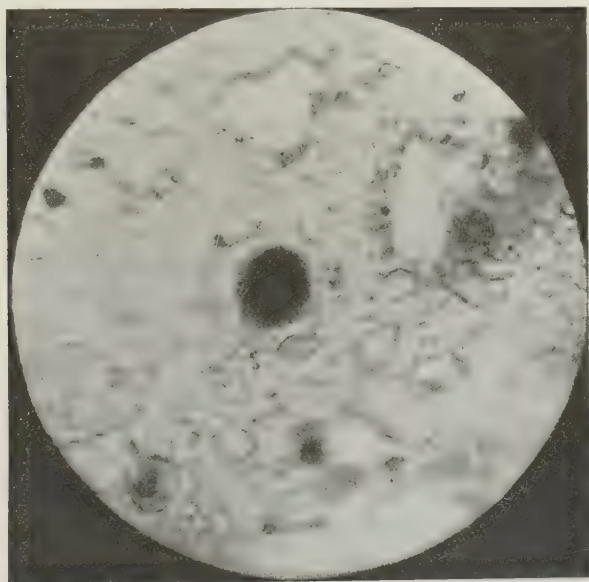


FIG. 1.

résistent à l'action des décolorants, plus que les microbes eux-mêmes. Il est donc impossible avec eux de distinguer quoi que ce soit dans des suspensions de terre.

MÉTHODE DE M. J. CONN. — C'est M. Conn, qui a tourné cette difficulté, la seule sérieuse à vaincre, en essayant l'emploi de colorants acides, comme l'éosine, la phloxine, le rose bengale, avec, comme mordant, l'acide phénique. On réussit alors à voir les microbes, colorés avec une intensité plutôt faible, sur



fond incolore, ou presque. Les meilleurs résultats lui ont été fournis par le rose bengale en solution aqueuse additionnée de 5 p. 100 d'acide phénique.

La manipulation destinée spécialement à la numération microscopique consiste à préparer une suspension de terre plus ou moins épaisse, selon l'échantillon à étudier : pour une terre argileuse, la suspension est 1 : 10 ; pour une terre sablonneuse, 1 : 5 et jusqu'à 1 : 3. Un gramme de terre est secoué avec le

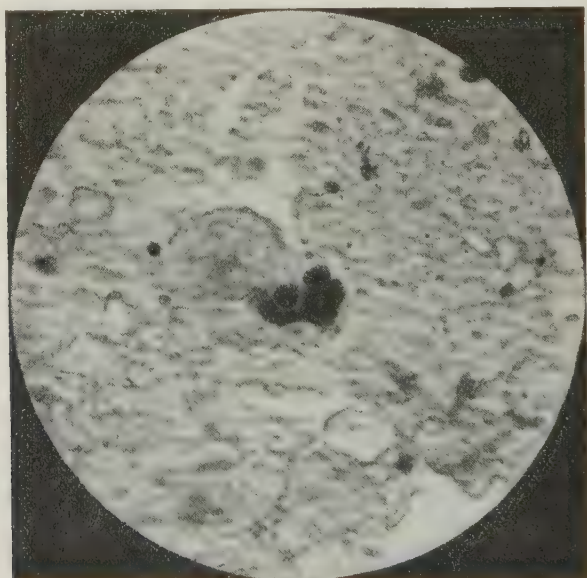


FIG. 2.

volume nécessaire d'eau additionnée de 0 gr. 15 de gélatine p. 1.000, ce qui suffit pour coller les particules terreuses à la lame. Sans laisser sédimenter, on prélève immédiatement 0 c. c. 1 de la suspension qu'on étale sur la lame, en couvrant 1 cent. carré. On laisse sécher, on couvre le carré de boue sèche par le colorant et on chauffe au bain-marie. On lave par immersion rapide dans l'eau, on sèche et on examine à sec au microscope.

Dans une bonne préparation, dit l'auteur, les bactéries sont

colorées en rose foncé ou rouge, les particules minérales sont incolores, la matière organique morte rose clair, mais le plus souvent elle est jaune ou incolore; si la coloration des bactéries est trop faible et celle du fond trop intense, c'est qu'on a lavé trop longtemps ou bien un excès de gélatine en est la cause.

NOTRE MÉTHODE. — Elle a été déjà résumée dans une note lue

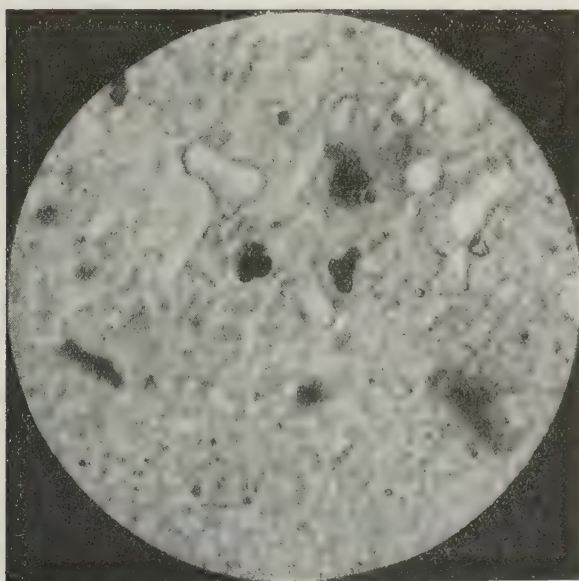


FIG. 3.

à la séance de l'Académie des Sciences du 18 août 1924 (1). Nous allons la décrire avec plus de détails, vu l'importance du sujet.

Le trait essentiel, c'est la dissociation des éléments de la terre, une sorte de microanalyse physique, qu'on lui fait subir. Nous y avons été amené après de nombreux tâtonnements qui nous ont montré qu'en se servant pour les préparations

(1) Sur l'étude microscopique du sol. *C. R.*, **179**, 1924.

d'une suspension de terre entière, il ne sera jamais possible de posséder des préparations laissant voir les microbes aussi clairement qu'on les voit dans différents autres milieux.

En effet, l'examen est rendu difficile par l'extrême hétérogénéité des éléments de la terre : même dans la *terre fine*, il y a quantité de grains de sable atteignant et dépassant 100  $\mu$ , soit couvrant tout un champ de vue de l'immersion 1/18. On comprend que ces dimensions, la forte réfringence, les con-

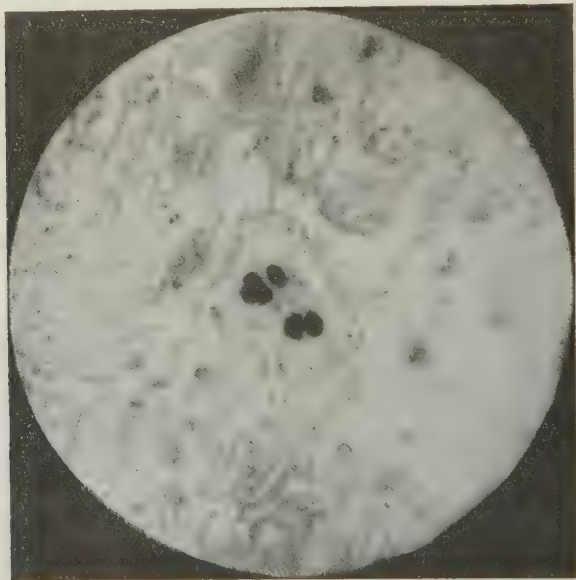


FIG. 4.

tours noirs, la profondeur qu'ils donnent à la préparation, gênent l'examen au point de lui faire perdre toute valeur. Entre ces débris et les particules minérales minuscules de la taille d'un microbe, il y a toutes les transitions possibles. Plus ils sont petits, moins ils gênent l'examen et, quant au danger, souvent évoqué, de les confondre avec les microbes, il n'existe guère, car ils ne prennent jamais de coloration, sans parler de leur forme qui ne prête pas à confusion. Pour ce qui est des particules colloïdales, ou des rares débris organiques qui



retiennent quelquefois une teinte, ils ne rappellent en rien les formes microbiennes.

Le procédé de microanalyse physique doit conduire à la séparation des éléments de la terre selon leur poids et leur volume.

Ces éléments se composent, comme on le sait, de débris minéraux et organiques, de colloïdes minéraux et organiques, le tout imbibé de la dissolution du sol. Dans le premier sédi-

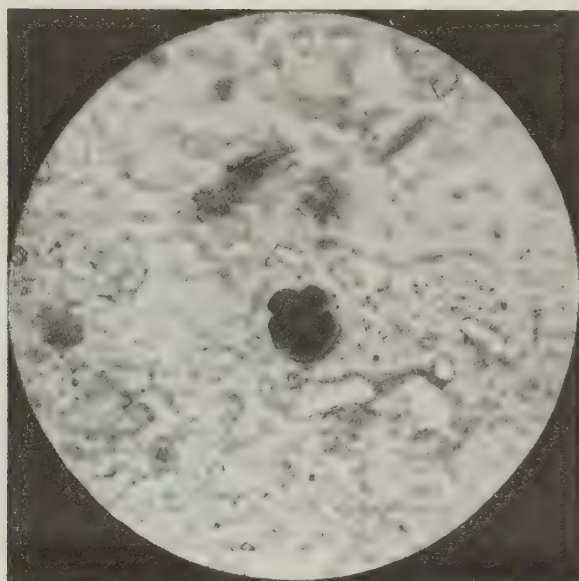


FIG. 5.

ment, on trouvera donc un maximum de débris minéraux relativement grossiers avec un minimum de particules colloïdales, argileuses et humiques; dans les sédiments suivants, les débris minéraux diminueront de taille et la proportion des colloïdes augmentera; dans la suspension non encore sédimentée, il n'y aura que des débris minuscules retenus en suspension par les colloïdales; enfin, dans la suspension centrifugée, les particules restées suspendues seront, selon l'intensité de l'action centrifuge, de la dernière finesse. En examinant à part les sédiments

successifs et les suspensions, on aura non seulement des préparations beaucoup plus claires — de moins en moins encombrées par des débris — dont l'étude se complétera mutuellement, mais on se fera encore une idée de la distribution des microbes dans le sol. En effet, il n'est pas sans intérêt pour un microbiologiste de savoir s'ils se tiennent sur les débris minéraux, grossiers ou fins, ou sur le colloïde, minéral ou orga-

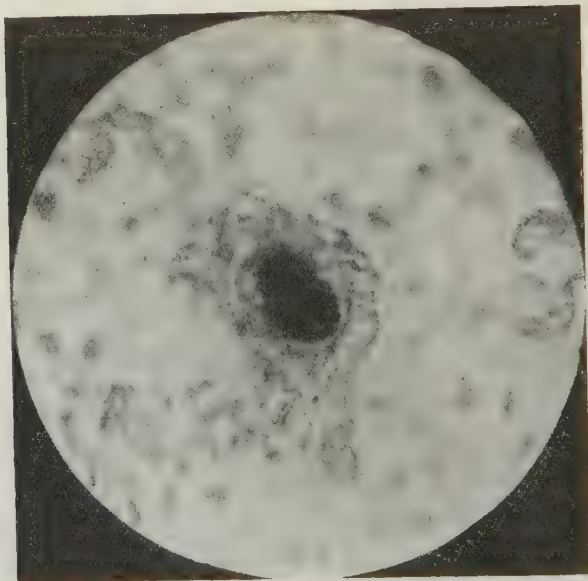


FIG. 6.

nique, ou s'ils pullulent simplement dans la dissolution du sol, comme dans un bouillon de culture.

Nous nous tenons à la manipulation suivante : un gramme de terre fine, calculée sèche, prélevé sur un échantillon bien homogène, est jeté dans 4 cent. cubes d'eau distillée et agité toujours de la même manière pendant cinq minutes. On laisse déposer trente secondes et on décante la suspension couvrant le dépôt formé dans un petit tube de centrifugeur à main. On ajoute encore deux fois 3 cent. cubes d'eau et, après avoir agité chaque fois une minute et laissé déposer trente secondes, on

décante dans le même tube de centrifugeur. On prend donc en tout dix parties d'eau pour une de terre. Après ces trois lavages le *premier dépôt*, resuspendu dans l'eau distillée, se sédimente momentanément en laissant l'eau claire. Pendant ces manipulations, qui prennent environ dix minutes, un *second dépôt* se forme dans le tube du centrifugeur. On enlève avec précaution environ la moitié de la suspension plus ou moins louche qui

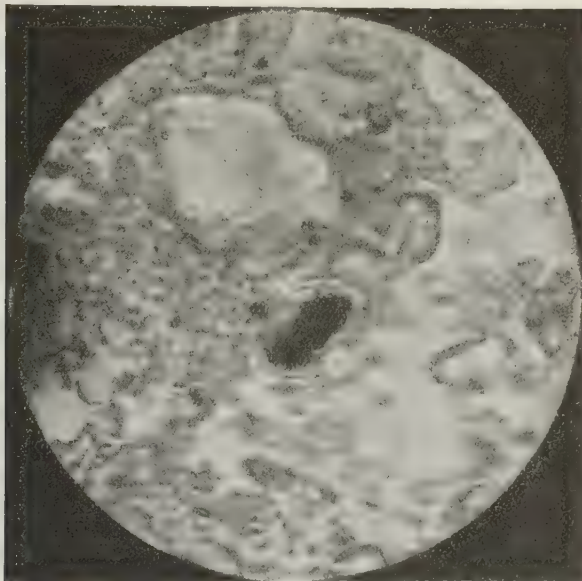


FIG. 7.

couvre ce dépôt, et on la fait couler dans un second tube de centrifugeur; soumise à l'action centrifuge, elle donnera le *troisième dépôt*. On fera une préparation de chaque dépôt, une de la suspension encore non centrifugée, enfin une de la suspension centrifugée à 100 tours de manivelle. Il est bon de centrifuger à deux reprises, à 50 et à 100 tours, et de prélever une goutte de chacune au moment opportun. Pour chaque échantillon, il y aura donc cinq à six préparations à examiner. Pourtant, il suffira souvent de réduire l'examen à deux ou trois.



La microanalyse terminée, le mode de préparation est tout simple. On prélève aux trois dépôts et aux deux (ou trois) suspensions une goutte de boue ou de liquide, au moyen d'une *anse jaugée*, dont le bout (l'anse même) est recourbé à angle droit; on étale la goutte sur la lamelle, en couvrant aussi exactement que possible 1 cent. carré; on sèche à l'étuve et on recouvre rapidement le carré avec une solution très

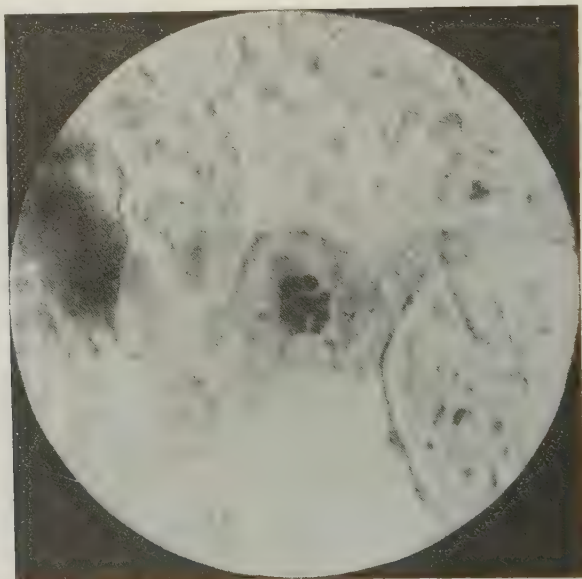


FIG. 8.

étendue de gélose (ce qui est beaucoup mieux que la solution de gélatine ou le collodion employé par M. Whittles).

Pour coller les préparations du premier et du second dépôt, on prend une gélose 1 : 100 à chaud; pour le troisième, 1 : 1.000 à froid suffit. Pour les suspensions, aucun fixatif n'est nécessaire; elles tiennent à la lamelle par leurs colloïdes; au besoin, on prendra 1 : 1.000. La gélose bien séchée, on fixe par quelques gouttes d'alcool absolu et on colore par un colorant acide phéniqué à 5 p. 100.

Le *rose bengale* proposé par M. Conn est utilisable, mais il

ne nous a pas donné satisfaction. La coloration des corps microbiens n'est pas assez brillante et elle pâlit trop facilement par le lavage, tandis que les colloïdes ne se décolorent pas assez facilement. Pour améliorer l'effet, il est bon de prolonger l'action du colorant et de faire agir ensuite, sans laver, une goutte d'acide acétique; la préparation vire au jaune clair, mais la couleur rose réapparaît après lavage : les corps micro-

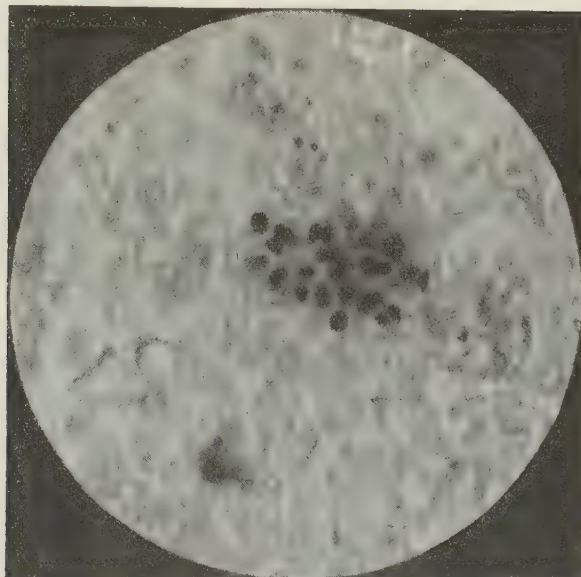


FIG. 9.

biens apparaissent alors mieux différenciés et colorés plus vivement.

Un autre colorant acide, l'*érythrosine extra*, également phéniqué à 5 p. 100, nous a donné des résultats nettement supérieurs. La coloration est des plus brillantes, et elle est limitée au corps protoplasmique en laissant incolores les capsules ou enveloppes des colonies et le mucus bactérien, ce qui permet de bien distinguer la structure de ces colonies. Cette propriété est précieuse, surtout quand il s'agit de colonies compactes comme celles de la *Nitrosomonade* et tant d'autres dans le sol,

qui se surcolorent si facilement avec les colorants basiques, tant qu'on ne voit que des corps opaques sans structure cellulaire visible. Nous croyons ce colorant appelé à rendre de bons services comme colorant général pour bactéries, à cause justement de son affinité pour le corps protoplasmique exclusivement. La coloration est aussi beaucoup plus stable qu'avec le rose bengale. Les colloïdes d'origine organique retiennent

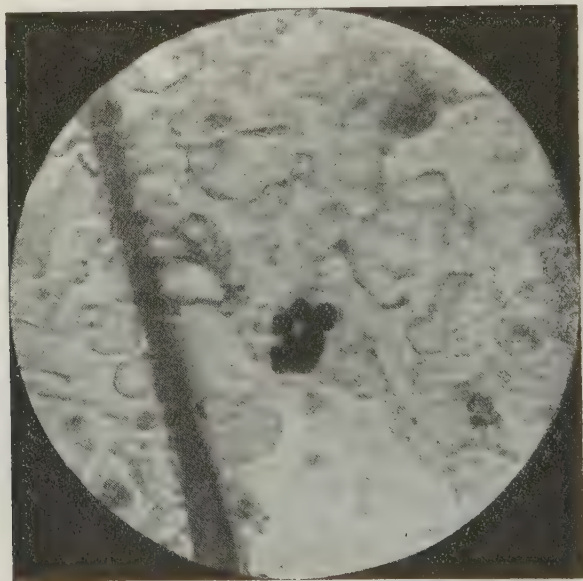


FIG. 10.

quelquefois une teinte après lavage. Toutefois, cette teinte n'est jamais écarlate comme celle des corps microbiens, mais d'un rose brique ou saumon assez pâle; de sorte qu'on distingue les microbes, même englobés dans ces substances teintées. La gélose cède facilement le colorant à un simple lavage à l'eau froide, mais les préparations à couche de gélose plus épaisse demandent quinze à trente minutes pour la décoloration. Ordinairement on laisse agir le colorant cinq à quinze minutes à froid ou en chauffant légèrement; on lave quelques secondes à l'eau, on examine dans l'eau.



Dans la préparation du premier dépôt, on ne trouve souvent que du sable presque pur, non seulement quand il s'agit d'une terre sablonneuse, mais dans toutes les terres dont les *grains* — composés comme on le sait de fragments minéraux cimentés par un colloïde — se laissent désagréger par l'agitation dans l'eau. Ces débris relativement grossiers ne sont jamais le siège des microbes, et on voit tout de suite l'utilité de commencer

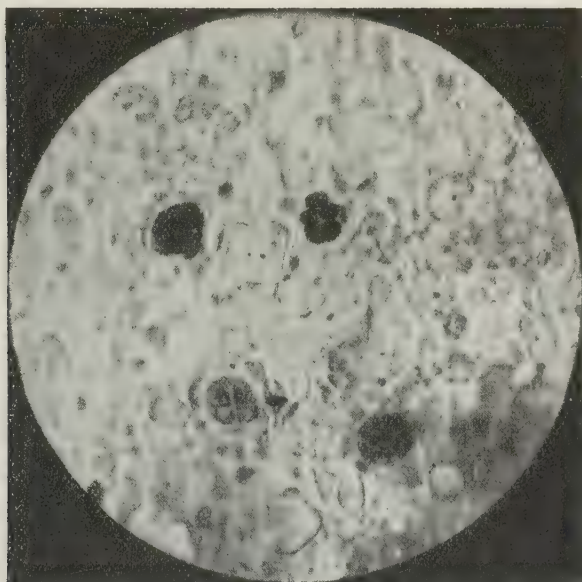


FIG. 44.

par les éliminer. Pourtant, dans les terres riches en matières humiques et en débris minuscules, on trouve des grumeaux non désagrégés dans le premier dépôt ayant subi trois lavages consécutifs. Dans ce cas, on y trouve des microbes, mais on en voit toujours moins et surtout moins clairement que dans les préparations plus fines; qualitativement, ce sont les mêmes.

La préparation du second dépôt est utile à examiner, mais on y trouve, aussi exactement qu'on en peut juger, les mêmes formes comme qualité et quantité que dans la troisième préparation, où l'examen se fait dans de meilleures conditions, en ce

sens que le fond est plus uniforme et plus transparent. Car il faut prendre son parti de ce que ce fond n'est jamais net — excepté avec un sol purement sablonneux exempt d'argile — mais formé par une couche presque ininterrompue de masses moutonnées, très finement granuleuses, incolores ou légèrement teintées de jaune, incrustées de débris minéraux et tachées de flocons ou grumeaux de matière brunâtre. Les microbes colorés

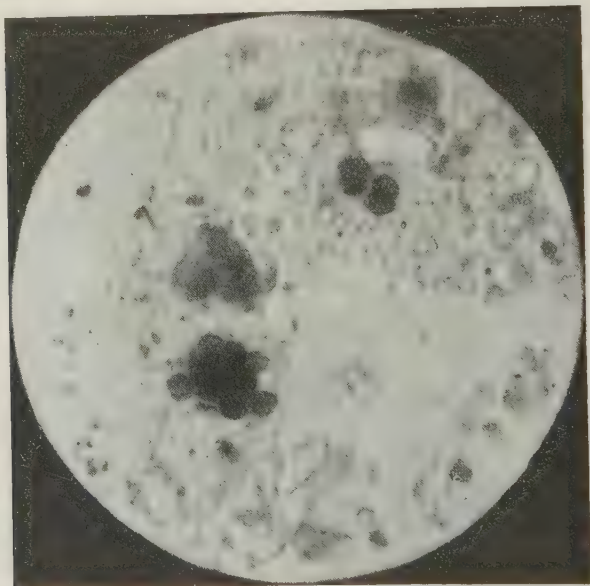


FIG. 12.

en écarlate s'en détachent à merveille, si ce revêtement est fin ; moins bien s'il est plus grossier. C'est ce qui fait que c'est la quatrième préparation, faite avec la suspension non centrifugée, qui est souvent la plus instructive.

L'examen des photogrammes n<sup>os</sup> 1 à 20 donnera une idée assez nette du caractère de ces préparations.

Quant à la suspension centrifugée (prép. 5 et 6), elle contiendra, en même temps que les particules les plus fines, la majorité des microbes qui ont pullulé dans la dissolution du sol et qui ne se tenaient pas sur les matières entraînées par l'action

centrifuge. Si donc il y en a qui aient pullulé dans cette dissolution, c'est dans ces dernières préparations qu'on devra les chercher, et c'est là leur intérêt principal. Comme on le verra, il y a des cas, où elles se présentent vides de microbes, et d'autres, où elles en sont pleines.

Il est à admettre que toutes les formes qui se présentent intensément colorées sont vivantes, car, d'après ce qu'on a

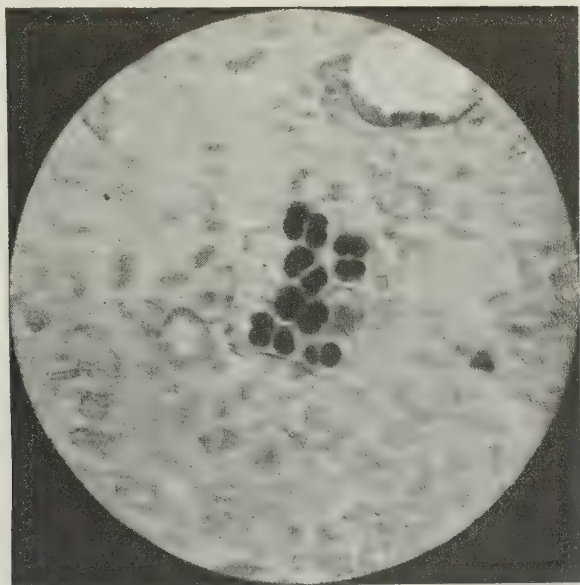


FIG. 13.

observé tant de fois, les cellules mortes cessent bientôt de prendre la couleur et disparaissent assez vite. Quant aux spores, elles ne se colorent que très faiblement, ou pas du tout, et on ne réussit à les voir dans les préparations que quand elles y sont présentes en grande quantité. Par contre, les kystes des protozoaires (amibes) s'imposent quand il y en a, par leur coloration intense et peuvent être facilement dénombrés.

**LA TERRE-TÉMOIN.** — La méthode microscopique la plus parfaite ne pourrait servir de base à une méthode expérimentale



que dans le cas où on réussirait à établir une population microbienne stable, population-type, qui servirait comme terme de comparaison. On partirait d'une terre normale et on étudierait avec soin sa microflore. Si ses caractères se laissent fixer, on disposerait d'un *état biologique* défini de la terre qu'on pourrait modifier expérimentalement. On provoquerait alors par des influences diverses des pullulations, ou cultures, nouvelles dans

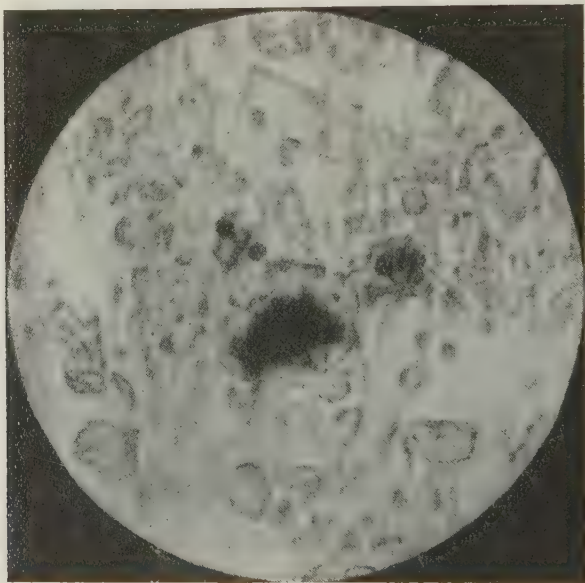


FIG. 14.

la terre même, qui se superposent à la florule stable et modifieront le peuplement microbien, comme qualité et quantité. Autrement dit, la terre répondrait par une *réaction biologique*, dont les caractères seraient à fixer à nouveau par l'examen microscopique direct. Cette réaction s'imposera à l'observateur d'autant plus que les formes nouvellement apparues seront plus différentes de la florule d'origine ; des différences moins accentuées seront plus difficilement constatables, mais sans qu'une constatation devienne impossible dans la grande majorité des cas.

Nous reviendrons à la méthode expérimentale qui s'y rapporte

dans le paragraphe suivant. En ce moment, il ne s'agit que de mettre en lumière la nécessité de posséder une terre type, ou *témoin*, comme nous l'appelons le plus volontiers.

Pour en trouver une, il était naturel de la chercher sur une parcelle qui n'a reçu aucun engrais pendant un temps le plus long possible, trois ans au minimum, et de la maintenir tout le temps en jachère noire bien propre. Une parcelle répondant à ces

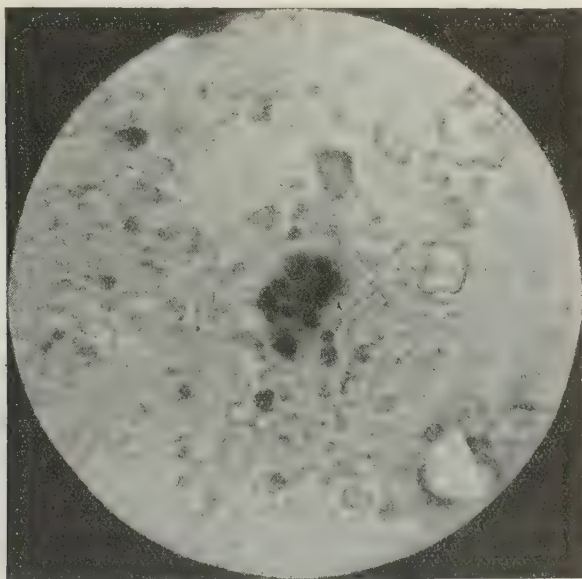


FIG. 15.

exigences a été choisie dans le domaine de l'Institut Pasteur à Brie-Comte-Robert. Son étude microscopique, particulièrement soignée, a confirmé toutes les prévisions ; ou plutôt, c'est cette étude même qui nous a suggéré l'idée d'une terre-témoin.

Mais, en élaborant une méthode générale, il n'était pas permis de se borner à un seul échantillon, et il importait de voir si d'autres, de provenances diverses, pourraient remplir le même rôle que notre terre-témoin, soit s'ils présentaient ces mêmes caractères, et cette même stabilité de la florule microbienne. On s'est adressé, en conséquence, à plusieurs confrères français,

américains, russes, avec prière de nous envoyer des échantillons pris sur des champs qui n'ont reçu aucune fumure pendant au moins trois ans. C'est un plaisir pour nous de remercier ces confrères pour l'obligeance avec laquelle ils nous ont fait parvenir une quantité d'échantillons, bien emballés dans des flacons hermétiquement clos (1). En somme, il nous est parvenu en bon état : vingt-huit échantillons d'origine française, douze



FIG. 46.

d'origine nord-américaine, cinq de Tunisie, cinq de Russie. Leur énumération exacte ne présente pas d'intérêt, aucun des échantillons n'ayant montré des caractères microbiologiques propres, de sorte que ni leur provenance, ni le type de la terre ne les différencient nettement au point de vue microbiologique.

Une vingtaine d'entre eux a été soumis à un examen micro-

(1) Je remercie particulièrement M. Alfred Bruno, de l'Institut des Recherches agronomiques, auquel je dois tant d'échantillons du pays ; le professeur S. Waksman qui s'est fait intermédiaire pour les terres américaines ; M. G. Truffaut pour des échantillons de Tunisie ; M. Lebediantzeff pour les terres russes, ainsi que tous ceux qui ont répondu à notre appel.



scopique complet ; il a suffi d'un examen rapide des échantillons restants pour confirmer l'analogie des résultats.

Nous nous occuperons plus spécialement de cinq échantillons, dont trois provenant de régions éloignées du pays, — Brie, Somme, Bas-Rhin —, un d'Amérique, un de Russie.

Sur la planche en couleur qui accompagne ce mémoire, on trouvera reproduits les tableaux microscopiques des florules

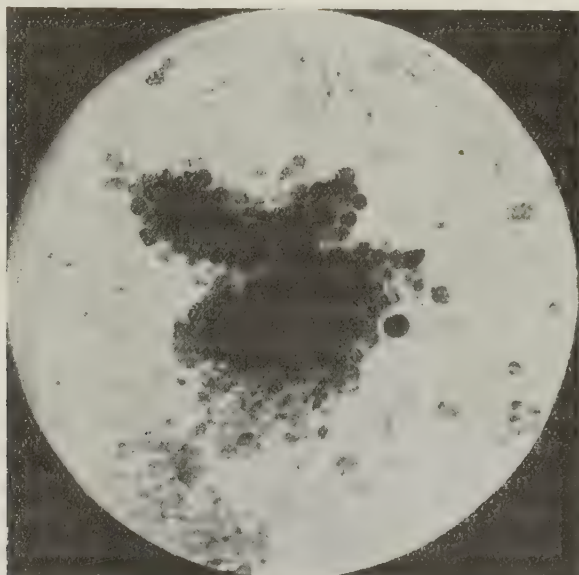


FIG. 17.

de ces cinq terres avec toute leur ambiance, dessinés d'après nature à l'échelle  $1\mu = 2$  millimètres, soit grossissement : 2.000. On n'y trouvera schématisée que la disposition des colonies, trop rapprochées, trop nombreuses, si on les compare à la réalité d'une préparation microscopique grossie à 1.000 diamètres, où on ne trouve, selon les terres, que de une à quatre colonies par champ. Le reste est conforme à la réalité autant qu'un dessin peut la reproduire.

Commençons par l'ambiance, qui doit présenter un certain intérêt pour les microbiologistes comme lieu d'habitat des

microbes qu'ils étudient ; d'autant plus que le sol n'a été étudié au microscope que par les minéralogistes et pédologues, de leur point de vue spécial et au moyen de méthodes différentes. Sans insister sur la question, ce qui pourrait nous mener loin, nous croyons notre mode de préparation, suivi d'un examen avec un puissant système à immersion, utile pour la connaissance des éléments ultimes d'une terre, en dehors des microbes qui y vivent. Ces éléments se présentent avec une grande clarté, et on a un tableau caractéristique, qui différencie bien un échantillon d'un autre. La forme et les dimensions des débris minéraux, tous compris dans la fraction « sable fin » de la macro-analyse physique, mais variant de taille de 100  $\mu$  et plus, à 1  $\mu$  ; les « corpuscules noirs » qui manquent presque totalement dans les « terres blondes », mais dont dépend probablement la pigmentation des terres brunes, où ils abondent ; les « corpuscules jaunes », ou verdâtres, généralement arrondis, très homogènes et réfringents, qui attirent l'attention dans une terre et manquent dans une autre ; la matière colloïdale incolore qui fait un fond épais, moutonné, granuleux avec des terres argileuses et qui se réduit à des nébulosités à peine perceptibles avec des terres sablonneuses ; enfin la matière colloïdale colorée, d'origine probablement organique, qui est d'une grande diversité d'aspect : tantôt ses flocons ou grumeaux sont légers et transparents, teintés jaune clair à contours diffus ; tantôt ils sont plus volumineux et compacts, formés quelquefois en masses arrondies, presque opaques, teintés dans des nuances de jaune-brun ou franchement brun, leur teinte naturelle ; il y en a encore qui retiennent une coloration métachromatique montrant une teinte brique ou saumon. Tous ces caractères, disons-nous, forment un ensemble assez typique et facilement saisissable pour un œil exercé.

Pour en avoir une idée, quoique bien imparfaite, il n'y a qu'à jeter un coup d'œil sur la planche en couleurs jointe à ce mémoire, où sont figurés les tableaux microscopiques des cinq échantillons.

La *terre de Brie* est relativement riche en colloïde, tant incolore que coloré en jaune brunâtre, et qui recouvre tout le fond par ses flocons. Quantité modérée de corpuscules noirs ; quelques corpuscules jaunes brillants.

L'échantillon de *la Somme* (étiqueté « terre calcaire type, près Montdidier ») se distingue du précédent par le fond tout recouvert de débris minéraux minuscules et par la quantité nettement moindre de colloïde.

L'échantillon du *Bas-Rhin* (étiqueté « ferme du Schaffbusch, station Riedseltz, près Wissembourg »), terre sablo-argileuse à teinte très claire, est caractérisée par le manque total de cor-

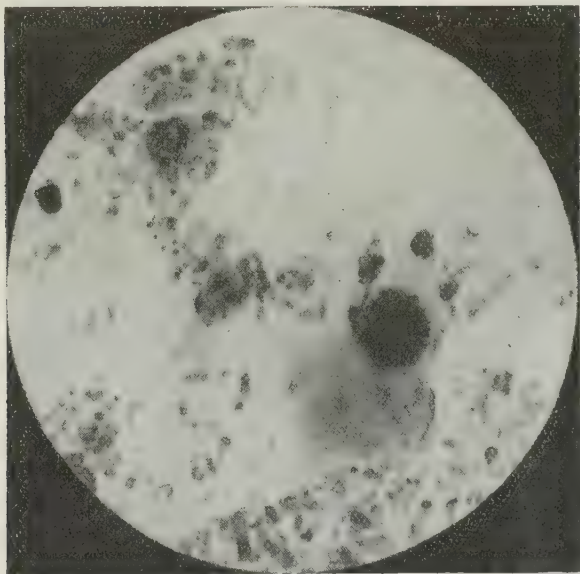


FIG. 18.

puscules noirs, par des flocons, peu abondants, de colloïde colorés en jaune pâle; par le colloïde incolore réduit à des ombres légères; par la grossièreté relative des débris minéraux.

L'échantillon de *Texas* étiqueté *Fine sandy loam, College-Station, Texas*) montre une abondance de colloïde, tant incolore que coloré, surtout de ce dernier, qui est formé de masses volumineuses diversement colorées. Débris minéraux relativement grossiers. Corpuscules jaunes assez abondants. Peu de corpuscules noirs, comme dans la terre de Brie (même teinte).

L'échantillon du *Tchernoziem*, ou *terre noire* (provenant de



la Station agronomique de Schatilovo, gouvernement de Toula), noir comme du charbon, frappe par la quantité énorme de corpuscules noirs de toutes grandeurs et formes et par la très grande abondance de colloïde teinté en brun, qui recouvre des champs entiers de microscope par ses masses, tantôt diffuses, tantôt formées de corps arrondis et presque opaques. Ces masses retiennent ou cimentent presque tous les débris miné-

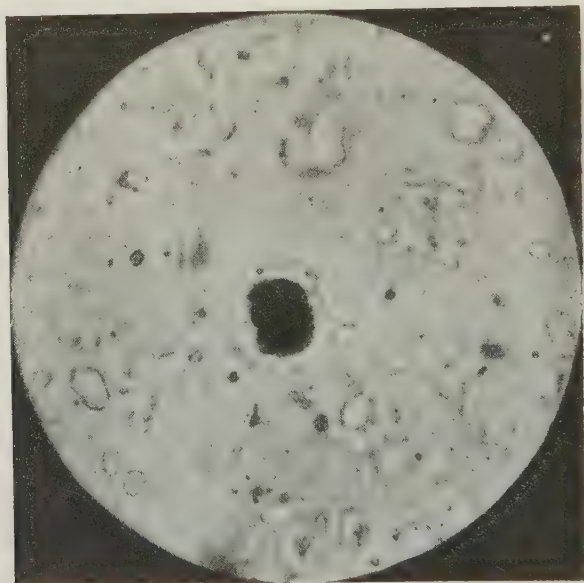


FIG. 19.

raux qui y sont englobés : caractère dont dépend la structure granulaire connue de ce type de terre.

Tous ces caractères permettent quelque orientation dans un milieu dont la microscopie a été encore si peu pratiquée par les microbiologistes, et c'est la raison pour laquelle on n'a pas cru devoir omettre ces observations. Elles gagneraient beaucoup en importance si on réussit, au moyen de réactions microchimiques appropriées, à se faire une idée de la nature de ces éléments : problème des plus importants, non seulement pour la microbiologie, mais pour toute la science du sol.

Passons maintenant à la population microbienne de ces terres.

Une morphologie purement descriptive serait ici de peu d'intérêt. Nous n'allons donc pas nous efforcer de démêler les formes autonomes, de les classer, ni de les caractériser chacune à part. Pour en avoir une idée assez complète, il suffit d'examiner la planche où ces formes sont assorties; on les retrou-

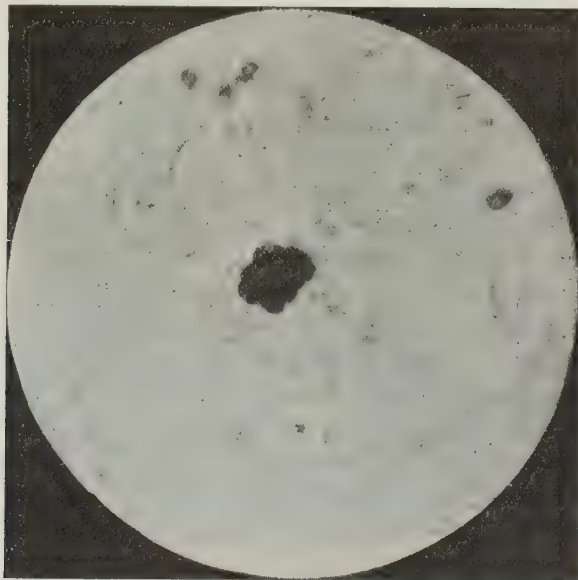


FIG. 20.

vera ensuite sur les photogrammes n<sup>os</sup> 1 à 21, où M. P. Jeantet, le très habile microphotographe de l'Institut Pasteur, a réussi à reproduire plusieurs d'entre elles. Leur morphologie fera l'objet d'études ultérieures.

Ce qui importe en ce moment, ce ne sont que les caractères généraux de la florule des terres-témoins. Nous allons les dégager, et nous serons ainsi amené à des déductions importantes pour la direction de nos recherches et pour l'élaboration d'une méthode générale.

Voici ces conclusions :

1. L'ASSORTIMENT des formes microbiennes composant la florule d'une terre normale est sensiblement le même dans tous les échantillons de provenance très diverse. On peut donc affirmer que toute terre arable normale — du moins d'ancienne culture et dans la zone tempérée — peut servir de base pour les expériences, au même titre que notre terre-témoin de Brie.

2. LES FORMES sont, pour la plupart, des formes arrondies, coccus ou coccobacilles. L'espèce en bâtonnets très ténus formant voile, qui se colore métachromatiquement en violet par l'érythrosine, fait exception (v. sur planche en couleur ci-après, et photogr. nos 5 et 8).

On voit aussi des formes anguleuses assez étranges. Les tailles s'échelonnent entre 3  $\mu$  et 1  $\mu$  et au-dessous. Les petites formes de 1  $\mu$  à 1  $\mu$  5 sont de beaucoup les plus fréquentes. Les grandes paraissent manquer assez souvent, et il faut toujours un examen méthodique et prolongé pour les trouver. Par leur aspect, ces grandes formes ressemblent beaucoup à des Azotobacters, et il est bien probable qu'ils représentent la forme originaire de l'espèce cultivée. Aussi, les échantillons où ils sont plus abondants donnent-ils facilement des cultures d'*Azotobacter*. Mais il arrive aussi qu'on en trouve dans une terre sans qu'il soit possible d'en tirer cette espèce. Ces grands cocci ne seraient donc pas tous des *Azotobacters*.

3. LE GROUPEMENT EN COLONIES est une caractéristique de la florule autochtone. Ces colonies sont tantôt grandes, de forme arrondie, composées de centaines de cellules, pressées en une masse compacte et entourées d'une capsule commune, parfois nettement visible (voir photogr. nos 6, 14, 16, 17, 19); tantôt elles ne contiennent que quelques dizaines d'individus. Il y en a qui sont composées de petits groupes en tétraèdre; d'autres en mérisme. Le bâtonnet métachromatique ne pousse que sous forme d'un voile à une seule couche de cellules (v. ph. 21). Le fait que les colonies ne sont pas toujours denses, mais qu'on trouve à côté de celles-ci des groupes lâches des mêmes individus, paraît démontrer qu'il y a alternance entre la formation d'une colonie et sa dispersion, avec formation transitoire probable de stades mobiles, comme dans le cas de la *Nitrosomo-*



nade décrit par nous avec détails il y a une trentaine d'années (1).

Ce qu'il convient de noter, c'est la rareté très grande, on pourrait même dire l'absence, de formes isolées, éparpillées assez uniformément dans le tableau microscopique, comme on le voit généralement dans des préparations de suspensions bactériennes : les colonies ou les groupes sont toujours séparés

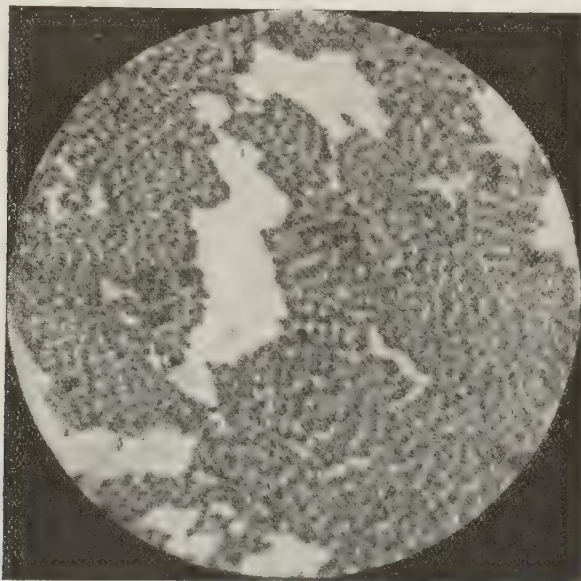


FIG. 21.

par des bandes ou des champs entiers complètement vides de microbes (voir ph. 4-21).

4. Il existe un rapport manifeste entre les colonies et certains éléments du sol : généralement elles sont logées sur les grumeaux du gel coloré, soit, probablement, sur la matière humique. On les observe dans cette position sur presque toutes les photographies, mais les n<sup>os</sup> 6, 7, 8, 14, 19 sont particulièrement démonstratives à cet égard. Cette affinité a pour conséquence que la suspension centrifugée est presque entièrement

(1) Contributions à la morphologie des organismes de la nitrification. *Archives des Sc. biologiques*, 4.

débarrassée de colonies qui tombent au fond, entraînées par les flocons du gel organique chargé de débris minéraux et ainsi d'un volume, ou poids, plus grand que les particules d'argile. L'examen microscopique paraît donc démontrer que les microbes autochtones sont attirés par la matière humique du sol, et il y a tout lieu de croire que leur présence sur cette matière n'est pas due au hasard, mais à une affinité spéciale et active.

5. Sont ABSENTS dans le tableau microscopique : *a*) les bacilles sporogènes des groupes *Subtilis* et *Megatherium*, ceux à formes renflées ou à tête (*Clostridium*, *Plectridium*), ainsi que les bacilles non sporogènes, filamenteux (*Fluorescens* et autres ; *b*) les formes spiralées ; *c*) les filaments mycéliens : il n'est pas très rare qu'on tombe sur des spores de champignons, mais leur nombre est très restreint ; *d*) les actinomycètes, s'il y en a, sont en trop petit nombre pour qu'ils trouvent place dans le tableau. Une remarque dans le même sens est valable pour les protozoaires. On trouve bien quelques kystes presque dans chaque préparation, en cherchant bien, mais, dans la terre-témoin, leur rareté est extrême. Pourtant il est facile de les voir devenir nombreux, en provoquant la pullulation des bactéries.

6. On voit donc le parti qu'on peut tirer de l'étude microscopique de la terre-témoin. Bien renseigné sur sa florule, d'un côté, sur les formes qui y manquent, d'un autre, on aura toute facilité pour noter toute pullulation nouvelle, qui se superposera à l'assortiment connu, et la mettre en rapport avec l'influence expérimentale mise en train. Non seulement on jugera comme réaction l'apparition de formes bacillaire ou autres, régulièrement absentes, mais même des formes en coccus semblables à celles de la florule, quand on les trouvera isolées et dispersées dans les préparations, jusque dans celle de la suspension centrifugée (prép. 5 et 6). De même, si on trouve dans un échantillon inconnu bacilles, champignons, spirilles, etc. en nombre, on conclura que la terre n'est pas normale, qu'elle est en état de fermentation ayant reçu récemment de l'engrais. Ou si on préfère le point de vue sanitaire, on la qualifiera de terre souillée.

7. Tous ces faits, révélés par l'étude microscopique des terres-témoins, nous suggèrent la conception de deux grands groupes de ferments du sol, différant par le caractère général de leurs fonctions. Appelons-les organismes qui ne pullulent qu'aux dépens de substances essentiellement fermentescibles en provoquant des processus relativement intenses de dédoublement, les *zymogènes*. Le second groupe qui vit, par contre, normalement dans une terre dépourvue de ces substances, qui fonctionne comme agent de la combustion lente des matières humiques, sera dénommé *autochtone* (1) au point de vue œcologique, ou *humivore*, quant à la fonction. L'activité du premier ne sera qu'intermittente : les périodes d'action intense seront coupées par des périodes de repos et d'attente d'un nouvel apport de substance fermentescible. L'expression de M. J. Conn, *watchful waiting*, donne une image très suggestive des relations réelles.

L'activité du second aura chance de se poursuivre sans interruption notable, mais lentement, à cause de l'allure toute différente du processus. L'avenir montrera s'il y a des organismes à fonction ambiguë, transitoire entre les deux groupes, et même une réponse positive à la question n'effacera pas les grandes lignes de la définition que nous proposons.

La portée de cette conception pour la direction des recherches est évidente. Elle nous dit une fois de plus que l'étude de fonctions si spécialisées exige des méthodes tout aussi spécialisées, et adaptées à ces fonctions ; et qu'il est vain d'aborder les problèmes biologiques du sol au moyen de quelque méthode arbitraire standardisée.

ÉVALUATION DE LA QUANTITÉ DES GERMES ACTIFS. — Cette évaluation se fait par l'examen au microscope, en ayant soin de procéder quantitativement. Remarquons tout de suite qu'il ne s'agit pas de numérations exactes. On pouvait comprendre à la rigueur les illusions qu'on se faisait sur ce point quand la méthode des plaques ne donnait, par gramme, que des millions ou des dizaines de millions de germes, au maximum, ce qui n'était qu'une partie intime de la quantité totale ; on ne le peut plus maintenant que le microscope nous révèle que c'est plutôt vers le demi-milliard

(1) Voir C. R., 178, séance du 7 avril 1924.



qu'il faut chercher, non le maximum, mais le minimum.

Pour s'orienter dans la question de la densité de la population microbienne dans le sol et pour en avoir une mesure facilement appréciable, faisons la simple expérience suivante : on fait une préparation de terre équivalente à notre n° 3 ou 4 (c'est-à-dire complètement dépourvue de débris tant soit peu grossiers), sur une lamelle, pesée exactement à la balance de précision, de manière que le liquide couvre bien uniformément 1 cent. carré ; on sèche, on pèse de nouveau ; la différence en plus donnera le poids des particules de terre fixées à la lamelle, ce poids sera ordinairement près de 0 milligr. 5. On colore, on examine au microscope à l'immersion 1/18 en se servant d'un micromètre oculaire à carreaux. Acceptons comme unité de surface 0,1 millimètre carré, qui trouve assez exactement place dans le champ visuel du système 1/18 ; sur 1 cent. carré de la préparation il y aura donc 10.000 fois notre unité de surface, ou autant de champs visuels. Supposons qu'il n'y ait qu'un seul microbe par champ, ce qui n'est jamais observé dans la plus pauvre culture, et il y en aura déjà 10.000 par demi-milligramme ou 20.000.000 par gramme. Tel est le nombre que nous obtenons quand il n'y a qu'un seul germe dans notre unité de surface ; et il devient clair que quand ce n'est qu'à des nombres de cet ordre que montent les numérations, ils ne peuvent se rapporter qu'à quelque petit groupe de germes, probablement inactifs ; car s'ils étaient actifs, s'ils étaient en train de pulluler, ils seraient sûrement plus abondants.

C'est surtout l'étude microscopique des terres-témoins, les plus pauvres en microbes, qui nous en donne la preuve : ainsi, malgré leur pauvreté, il y a bien dans les quelques colonies aperçues par 0,1 millimètre carré, quelques dizaines à une centaine de germes, ce qui fait déjà des centaines de millions par gramme. Quant aux terres où on a provoqué la pullulation des zymogènes, on trouve des centaines par champs et jusqu'à des masses innombrables.

S'il en est ainsi, les numérations faites au moyen de la méthode des plaques ne présentent que peu d'intérêt ; à moins qu'il ne s'agisse d'un groupe déterminé, notoirement peu nombreux dans le sol et d'un intérêt particulier. Pour déterminer la richesse totale des terres en microbes, il suffit de s'en tenir à

l'examen microscopique et à une évaluation approximative. On taxerait, par exemple, comme terres pauvres en germes actifs, celles qui en contiennent moins d'un demi-milliard par gramme ; comme moyennes, celles qui en renferment plus d'un milliard ; enfin, comme riches, celles qui comptent de un à plusieurs milliards. Si le besoin s'en faisait sentir, on pourrait établir facilement un barème plus détaillé.

2. **Culture dans la terre naturelle.** — Cette culture ne demande ni préparation du milieu, ni inoculation. On se sert de terre fraîche avec tous ses germes ; bien entendu, c'est de la terre-témoin dont il est fait usage.

Il suffit d'y incorporer une substance énergétique pour rompre son équilibre biologique relatif et pour provoquer immédiatement la pullulation de germes zymogènes, qui s'y tenaient à l'état de vie latente. Une culture en résultera, jamais pure, bien entendu, mais beaucoup plus instructive dans notre cas qu'une culture pure.

On verra des cas où l'apport d'une substance sera suivi de la pullulation d'une *seule* forme : substance et pullulation, pullulation et fonction apparaîtront alors en relations très claires de cause à effet. Dans d'autres cas, un petit groupe de formes envahira la terre. Il y en aura, enfin, d'autres encore où le tableau sera plus compliqué, mais sans qu'il soit impossible de le démêler en s'aidant de la *culture auxiliaire*.

On se demandera peut-être si les cas où les formes sont multiples et variées ne seront pas assez nombreux pour rendre trop souvent le jugement difficile et incertain.

Les cas qui se présentent à l'étude sont si nombreux et si divers qu'on comprendra qu'il ne nous a été possible que d'en étudier un certain nombre des plus saillants. Il se peut qu'il s'en trouve d'autres, trop embrouillés pour pouvoir être tirés au clair. Mais même alors le *paysage microbien*, autant qu'on réussira à l'analyser par l'examen microscopique combiné à la culture auxiliaire, pourra nous aider à la compréhension des phénomènes complexes qui se jouent dans les conditions naturelles.

Ces *paysages* sont en général beaucoup moins mélangés qu'on se le figure d'après les expériences en culture pure. C'est

qu'au laboratoire on réussit généralement à imposer à une espèce isolée des régimes très divers, auxquels celle-ci s'accommode plus ou moins, surtout quand on y met du temps; et il advient que plus une espèce est soumise à ces épreuves, et plus la liste des substances notées comme utilisables par elle devient longue; il y en a même qui sont qualifiées d'omnivores. Or, malgré tout l'intérêt physiologique de ces expériences, elles font souvent perdre de vue la loi, si importante, de la *spécialisation des fonctions* des microbes, qui régit tout le chimisme des milieux naturels, qui fait des microbes des réactifs chimiques très sensibles, agissant chacun à son tour au moment opportun. Depuis quarante ans, tant d'exemples frappants de cette loi nous sont fournis qu'il nous paraît superflu d'y insister plus longuement. Certes, les exemples les plus marquants sont entourés, pour ainsi dire, de bien d'autres, où les lignes de démarcation ne sont guère nettes, mais ce manque de différenciation physiologique nous paraît dû en majeure partie à la culture artificielle, qui possède, comme nous l'avons déjà remarqué, des moyens puissants pour augmenter l'amplitude des oscillations fonctionnelles, jusqu'à la perte de toute individualité.

Et quand les rôles s'effacent, le mécanisme, ou plutôt les idées qu'on s'en fait, ne deviennent que sommaires et confuses. Car il ne paraît pas douteux que, dans la nature, ces rôles existent et qu'ils sont réglés par le jeu des forces naturelles. La compétition y fait qu'un processus ne s'établit qu'à la suite d'une sorte de lutte, et qu'il est remplacé par un autre, aussitôt qu'il commence à faiblir. Il est clair que cette lutte doit tendre plutôt à la spécialisation des fonctions, en faisant dépendre l'action d'une conjoncture optima, quand cette action est en état de prendre son élan maximum. Aussi, les phases de la décomposition des matières organiques dans le sol sont-elles liées à des pullulations quasi explosives qui se succèdent jusqu'au rétablissement d'un équilibre relatif. Et la loi que nous avons mise en relief montre que chacune de ces phases est l'œuvre d'un groupe peu nombreux, ou même d'une seule forme, qui s'imposera à l'observateur par sa prédominance et dont il sera relativement aisé de s'emparer par la culture auxiliaire.

Ces cultures microbiennes spontanées peuvent être mises en



train par des actions physiques, chimiques, biologiques. En laissant de côté les influences purement physiques, comme la température, ou purement biologiques, comme, par exemple, l'inoculation de germes étrangers à la terre, nous nous bornons à l'incorporation à la terre-témoin de substances diverses et de l'eau.

Nos expériences sur un sujet si vaste n'ont porté jusqu'à ce jour que sur cinq cas, et ce n'est pas dans ce mémoire, consacré à la méthode, que nous les rapporterons en détail. Nous ne les résumerons que très brièvement, pour donner quelques exemples de l'efficacité de cette méthode.

1. On incorpore à notre terre de la substance hydrocarbonée fermentescible : glucose, mannite, amidon. L'azote y étant au minimum, on prévoit que les conditions y seront propices aux espèces *oligonitrophiles*, d'après la terminologie de M. Beijerinck, aux fixateurs, en première ligne.

*Résultat* : pullulation imposante de grands *coccus* qui envahissent tout le champ et qu'on retrouve en masse jusqu'à la suspension centrifugée. Dans celle-ci (prép. 5 et 6), aspect d'une culture pure. On reconnaît facilement les *Azotobacters*, ce qui est pleinement confirmé par la culture.

2. On élève graduellement le rapport N/C en ajoutant de l'azote nitrique avec de la mannite.

*Résultats* : à 5 p. 1.000 de mannite, la pullulation des grands *coccus* libres est très réduite; à 7 p. 1.000 on n'en voit plus aucun. D'autres formes apparaissent, dont des filaments mycéliens.

3. On incorpore une faible dose de peptone.

*Résultats* : pullulation explosive de deux bacilles sporogènes, dont l'un domine. Au bout de quinze heures, à l'étuve, tous les champs sont couverts par des masses innombrables, déjà à l'état sporulé. On isole facilement ces deux espèces par la culture auxiliaire.

4. On donne une faible dose d'urée pure.

*Résultat* : forte odeur d'ammoniaque au bout de quinze à

vingt heures. Deux petits bacilles ont pullulé, dont l'un plus trapu, l'autre plus ténu. La quantité, malgré l'effet si marqué, est très restreinte (l'urée étant un aliment plus que médiocre), mais on les distingue nettement dans la suspension centrifugée. On les retrouve sur les plaques auxiliaires.

5. On élève graduellement le taux d'humidité d'une terre glucosée ou mannitée contenue dans des cylindres de différentes profondeurs (1) (voir ci-dessous).

Résultat : à 42 p. 100 de sa capacité totale pour l'eau, la terre est envahie par le *Clostridium Pastorianum*, qui manque seulement dans la couche supérieure de 2 centimètres d'épaisseur, laquelle est pleine d'*Azotobacters*. Odeur butyrique prononcée.

Ces exemples suffisent pour montrer le parti qu'on peut tirer de la méthode. On voit que l'apport d'une substance a l'effet immédiat et rapide de faire entrer en scène l'espèce qui est la mieux adaptée à l'utiliser dans les conditions données. La pullulation des espèces connues ou caractéristiques est directement constatable au microscope, ainsi que l'évaluation de leur densité, si l'on veut y mettre le temps et la patience nécessaires. Celles qui ne sont pas reconnaissables peuvent être différenciées et identifiées au moyen de la culture auxiliaire.

La méthode provoquera-t-elle des réactions identiques dans les terres-témoins différentes? Il est difficile de le prédire, mais l'identité paraît peu probable. Si les différences sont constantes et sont bien marquées, elles pourront servir à individualiser les différents types de terre au point de vue biologique.

Largement développées, ces expériences nous amèneront à une méthode d'analyse microbiologique complète, qui nous permettra de déterminer avec sûreté les *zymogènes* contenus dans une terre mise à l'étude.

Quant aux *autochtones*, en dehors des *Azotobacters*, la méthode leur est trop difficilement applicable. Pour persévérer dans la même direction, voudrait-on faire pulluler les humivores dans leur terre même en y apportant des matières humiques? On se heurterait aux incertitudes dues aux caractères chimiques peu

(1) Sur l'étude de l'anaérobiose dans la terre arable. C. R., 179, séance du 3 novembre 1924.

définis de ces substances. Si même on réussit à provoquer des pullulations nouvelles, il n'y aurait qu'une différence quantitative, difficilement appréciable dans ce cas, vu le caractère de leur végétation (colonies), et surtout l'extrême lenteur de leur multiplication. Par conséquent, leur fonction ne peut être étudiée qu'au moyen de la culture sur un milieu spécialement favorable à son exercice et à sa démonstration. La même remarque se rapporte exactement aux organismes de la nitrification trop difficiles à reconnaître à l'aspect entre les colonies naturelles (zooglées) de coccus et de bâtonnets minuscules, dont se compose la florule autochtone ; sans parler de leur croissance très lente qui prolongerait trop ces expériences.

TECHNIQUE. — Elle est des plus simples : On prend de la terre sur la parcelle-témoin, en prélevant une cuillerée sur chaque demi-mètre. On passe par le tamis 12 ou 14, on ramène l'humidité à un taux convenable qui peut varier entre 18 et 22 p. 100 s'il s'agit des aérobies. On incorpore la substance en poudre sèche, on introduit 50 grammes de cette terre dans les boîtes de Petri de 9-10 centimètres de diamètre, on égalise et on tasse en pressant légèrement avec une spatule. On les place dans un grand cristalliseur à couvercle pour prévenir une dessiccation rapide. De cette manière, l'humidité n'a pas besoin d'être renouvelée, les expériences étant généralement de courte durée.

Quand il s'agit d'anaérobies, on emploie des cylindres en verre de 5 centimètres de diamètre, ouverts aux deux bouts, de longueurs différentes : 10, 15, 20 et 25 centimètres. Pour les charger, on bouche l'un des bouts avec un bouchon de liège bien paraffiné, et on les remplit à hauteur voulue de terre additionnée de substance énergétique, en tassant au fur et à mesure du remplissage par des coups répétés jusqu'à ce que le cylindre de terre ne diminue plus de volume. Ce dispositif permet de faire pulluler les groupes aérobie et anaérobie dans les différentes couches d'une même colonne de terre et de trouver par examen direct le *niveau de l'anaérobiose* (1), en étudiant la surface libre des cylindres d'un côté, le fond, de l'autre, au-dessus du bouchon qu'on enlève à la fin de l'expérience. On évite ainsi de fouiller

(1) Sur l'étude de l'anaérobiose dans la terre arable. Voir C. R., 179.



la colonne, ce qui rendrait l'examen imprécis ou même défectueux.

3. *Culture auxiliaire.* — CHOIX DU MILIEU SOLIDE. — Le milieu liquide étant à proscrire dans les études sur les microbes du sol, aérobies surtout, le milieu solide est obligatoire. On a proposé un nombre de formules qui sont toutes à base de gélatine ou géllose, dont l'emploi ne nous paraît pas indiqué dans ce cas. En fait de milieu solide, la tâche qui s'impose ici est de créer un milieu microbiologique reproduisant les conditions spéciales au sol, lequel est une masse minérale riche en colloïde, pauvre en substance organique et en azote. Il est donc tout indiqué d'employer une base minérale, qu'on pourrait charger ou imprégner de substances très diverses, de manière à préparer un milieu spécialisé ou électif. C'est dire que la silice gélatineuse ou le silico-gel est seul applicable comme base générale des milieux destinés à isoler les microbes du sol, à les différencier et à étudier leurs fonctions. Il y a des cas exceptionnels pourtant où l'emploi de la géllose ne présenterait pas d'inconvénients.

On sait que la silice, comme substance gélatinante, a été proposée il y a plus d'une trentaine d'années, mais son emploi s'est borné aux microbes nitrifiants. Pour éviter la dialyse, M. Beijerinck a simplifié le procédé en mélangeant des solutions titrées de silicate et d'acide chlorhydrique de manière à avoir une solution neutre et en ajoutant un sel ammoniacal avant la prise ; ce mode de préparation a le défaut de laisser trop de chlorures dans le milieu.

Pour l'éviter, ainsi que pour faire encore un pas dans la simplification, nous procédons ainsi : on mélange de l'acide chlorhydrique étendu (densité de 1,40 B<sup>e</sup>) et du silicate de potasse étendu (densité de 1,06 ou 6-8 B<sup>e</sup>), à volumes égaux, en versant la solution de silicate dans l'acide et en agitant bien. On distribue ce mélange immédiatement dans des boîtes Petri de 9-10 centimètres, à raison de 30 c. c. par boîte, de manière que la couche soit plutôt supérieure qu'inférieure à un demi-centimètre d'épaisseur. On les laisse sur une surface horizontale pendant vingt-quatre heures ou plus. La prise se fait lentement ; on reconnaît que le gel est suffisam-

ment solide en frappant de petits coups sur la boîte : la main qui la tient perçoit des vibrations bien prononcées, qui sont un signe que la couche du gel est suffisamment élastique et résistante pour subir les manipulations sans se détériorer. On lave alors vingt-quatre heures à l'eau courante, puis à l'eau distillée bouillante en inondant plusieurs fois la surface du gel. Cette eau de lavage doit donner une réaction franchement violette avec le bromo-crésol-pourpre et ne donner aucun trouble avec le nitrate d'argent. Les boîtes ainsi préparées peuvent être tenues en réserve un temps très long en les préservant de la dessiccation, jusqu'au moment de s'en servir. Pour transformer le gel en milieu nutritif, on l'imprègne de la solution voulue, ou on l'enduit d'une suspension, en versant la quantité nécessaire à l'état bouillant sur la surface et en laissant évaporer lentement jusqu'à ce que la surface ne laisse voir aucune trace de liquide. Ce qui est important, c'est d'arrêter le séchage à temps; le moment convenable passé, la couche commence à se fendiller, devient trop dure et n'entretient plus si bien la diffusion.

On a reproché à ce milieu de ne pas se prêter à la stérilisation à l'autoclave. Nous verrons qu'il est possible de s'en passer, et la raison en est que les milieux solides à base minérale sont si électifs qu'ils ne craignent pas les souillures accidentelles par les germes étrangers. De simples mesures de propreté suffisent pleinement dans la majorité des cas. On verra des cultures sur plaques rester en bon état des semaines et des mois, malgré des examens répétés, sans jamais montrer ces végétations spontanées, inévitables sur milieux à la gélose, à plus forte raison sur les milieux à la gélatine. C'est un avantage précieux, surtout quand on a affaire à des microbes à pullulation tellement lente qu'il serait impossible d'en avoir des cultures sur un milieu concurrencé par des microbes banaux.

Les formules nombreuses que nous employons pour la culture auxiliaire des différents groupes physiologiques seront mentionnées dans les mémoires spéciaux qui traiteront de ces groupes.

MÉTHODE DES GRAINS DE TERRE. — Pour faire reprendre ou

pour isoler les microbes de la terre, la règle sera donc d'inoculer directement le silico-gel nutritif à formule élective par la terre qu'on étudie. La reprise des microbes, des plus difficiles, se fait alors avec une facilité telle, qu'il est presque permis d'envisager ce milieu comme une reproduction microbiologique du milieu naturel.

La manière d'inoculer le gel avec de la terre n'est pas indifférente. Le procédé usité est, comme on le sait, de préparer des suspensions plus ou moins diluées, dont on inocule une goutte dans la masse fondue, ou qu'on étale sur la surface solidifiée, pour que les germes, écartés, puissent se mettre en train sans se gêner mutuellement. Or, ce procédé n'est bon que quand il s'agit de faire apparaître des colonies quelconques pour les dénombrer. Mais quand on veut opérer une sélection, il est au contraire préférable de ne pas écarter les germes, ni de délayer la terre, mais de la déposer comme elle est, en « grains » naturels. On laisse ainsi libre jeu aux compétitions microbiennes, et le résultat est que le « grain » s'entoure de végétations du microbe spécifique qui devance et qui étouffe toute pullulation des germes qui ne trouvent pas leur conjoncture physiologique dans les conditions données. Une colonie se forme très rapidement ayant le grain pour centre, et en l'examinant au microscope on est frappé de ce qu'elle présente d'un coup une uniformité et une pureté qui ne laissent rien à désirer. Voudrait-on procéder à l'isolement définitif, on ne pourrait trouver de meilleure occasion.

La méthode est aussi sûre que rapide pour découvrir, dans un sol donné, les agents microbiens à fonction déterminée, et même pour avoir une idée de leur densité dans le milieu. Nous insisterons donc sur quelques détails de la manipulation.

On prélève un échantillon bien représentatif d'une parcelle donnée, en prenant une cuillerée de terre sur chaque demi-mètre. On mélange soigneusement, on passe par le tamis n° 20 et on procède sans retard à l'inoculation.

Sur le bout, légèrement humecté, d'une baguette de verre fraîchement étirée en aiguille très fine, on attrape les petits grains de l'échantillon et on les dépose en rangs réguliers, pour que le contrôle soit plus facile, sur la surface du gel. Quand l'échantillon est meuble et modérément humide, la

structure granulaire est très prononcée, et il est facile de prendre des grains à peu près uniformes. On en dépose le même nombre dans toutes les boîtes de Petri du lot — une cinquantaine, une centaine — ce qui permettra un jugement sur la fréquence relative du microbe dans la terre.

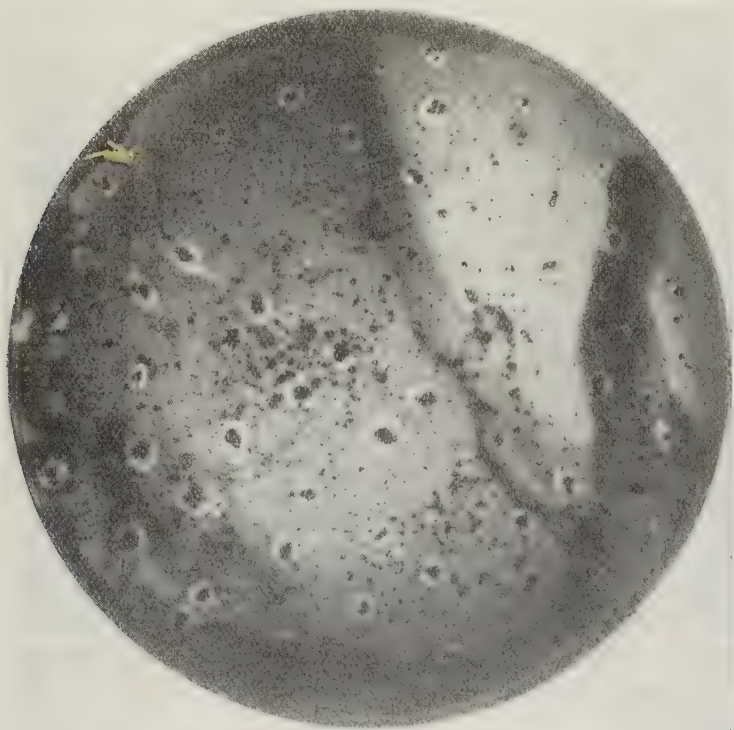


FIG. 22.

La méthode est surtout précieuse pour découvrir les fixateurs aérobies, les *Azotobacters*. Les grains sont déposés dans ce cas sur le silico-gel mannité. De grandes colonies, atteignant 1 centimètre et plus se forment au bout de quarante-huit heures autour des grains, et on ne se trompe jamais en les attribuant à l'*Azotobacter*, comme le démontre un contrôle microscopique suivi. Les grains qui ne s'entourent pas de ces grandes colonies ne donnent pas de colonies apparentes. Ce qui



permet une évaluation, c'est que le pourcentage des grains fertiles est nettement différent pour les différents échantillons. Ainsi, pour une parcelle de terre fumée, nous le trouvons constamment double de celui de la terre témoin; pour une terre mannitée et tenue à l'étuve pendant trois jours, il atteint les 100 p. 100. Dans plusieurs autres échantillons, il était à 0, et le contraste entre ces séries de grains stériles et ceux à *Azotobacter* était des plus frappants.

Appliquée aux *nitrificateurs*, la méthode permet de les découvrir avec la plus grande facilité. La réaction nitreuse sur les plaques de silico-gel à sel ammoniacal ne tarde pas à paraître; on la constate au bout de quelques jours. Les colonies restent invisibles à l'œil nu. Mais si on examine au microscope les grains déposés sur le gel, on les voit entourés d'une sorte de croûte composée de corps brillants de forme arrondie. En y prélevant une préparation, on voit que ces corpuscules sont des colonies de la *Nitrosomonade* à l'état pur, du moins comme tableau microscopique.

Le photogramme n° 23 représente une partie de cette croûte, composée de colonies de la *Nitrosomonade* ayant entouré le grumeau de terre. On a même réussi à suivre sa formation: au bout de quatre à cinq jours après que le grain a été déposé, on a vu des monades mobiles, en quantité, essaimer avec une grande agilité dans la couche capillaire de liquide qui se maintenait autour du grain. Cette période de mobilité a duré deux jours, et c'est elle, bien sûrement, qui a eu pour résultat la dispersion des germes, lesquels, devenus immobiles, ont repululé en colonies.

C'est cette même méthode qui nous a permis de découvrir la *fonction humivore* des microbes autochtones. Déposés sur la surface du silico-gel enduit d'humate de chaux et brun, par conséquent, nous avons vu les grains s'entourer d'un mucus ou d'un voile bactérien et l'enduit brun disparaître sous leur action en laissant des zones claires (Voir le photog. n° 22). Le phénomène est extrêmement lent; il faut attendre de longues semaines pour que ces végétations s'étendent plus largement sur les plaques. De ces colonies, nous avons réussi sans difficulté à isoler quelques espèces caractéristiques, dont l'activité humivore n'est guère douteuse. Nous attirons l'attention sur le

petit bâtonnet en voile que nous avons retrouvé dans toutes les terres étudiées, qui paraît donc très répandu. Depuis des mois il couvre nos plaques enduites d'humate de chaux, préparé de la manière ordinaire, sans autre addition (voir ph. n°21).

En général, la méthode est indiquée dans tous les cas où les grains deviennent des centres de végétations caractéristiques, comme avec les *Azotobacters* ou la *Nitrosomonade*, ou

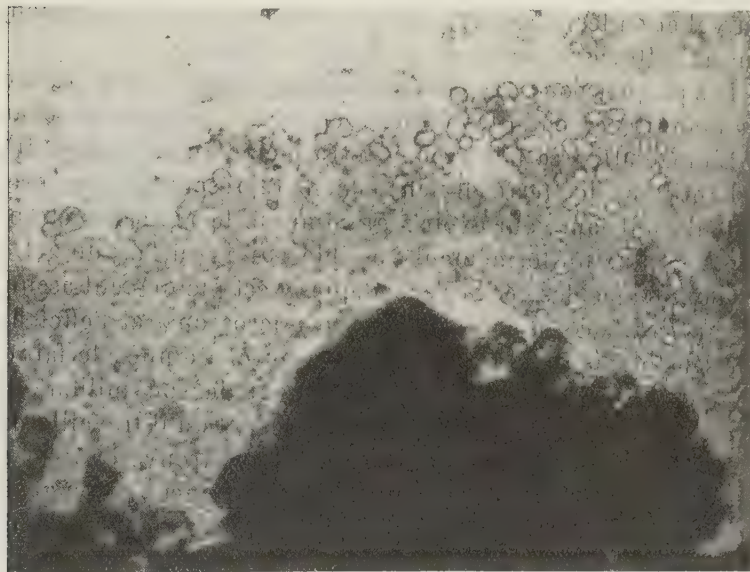


FIG. 23.

bien les centres d'une action chimique facilement appréciable, comme avec les matières humiques, l'amidon et surtout la cellulose.

Toutes ces observations ne sont mentionnées ici que pour démontrer le parti qu'on peut tirer d'un procédé si simple.

**GRANDES PLAQUES.** — Pour étudier le *pouvoir nitrificateur*, ainsi que le *pouvoir fixateur* d'une terre, — dans le sens qu'on donne actuellement à ce dernier, c'est-à-dire, fixation de l'azote par l'*Azotobacter* aux dépens de la mannite ou du glucose, — nous nous servons de grandes plaques de silico-gel, du diamètre de 20 centimètres —. Pour avoir une couche

d'environ 1/2 centimètre d'épaisseur, on y verse 200 centimètres cubes du mélange, silicate et acide; le lavage dans l'eau courante exige deux à trois jours.

Les plaques pour les nitrificateurs sont enduites de phosphate ammoniaco-magnésien, sel insoluble, dont on peut suivre à l'œil la disparition par l'action de la Nitrosomonade. Il y est, de plus, aussi aisé que dans une solution aqueuse de suivre la marche du processus en découpant des particules minuscules du gel et en les jetant dans le réactif Trommsdorf, la diphénylamine sulfurique, ou dans le réactif de Nessler.

Les plaques pour *Azotobacters* sont imprégnées de 2 grammes de mannite et enduites d'un précipité de carbonate de chaux.

L'inoculation se fait avec la terre même qu'on étudie. D'un échantillon de terre fraîche, bien représentatif, on prend autant qu'il faut pour avoir 1 gramme de terre sèche, et on le sème le plus uniformément possible sur la surface du gel. La prédominance des germes spécifiques y est pleinement assurée, ce qui est facile à contrôler par le microscope, et l'effet final est sensiblement égal à une culture pure. De plus, le fait que l'agent microbien provient directement de son milieu, sans avoir passé par des cultures artificielles, et qu'il travaille dans des conditions rapprochées de celles qu'il trouve dans le sol, est de nature à faire croire que ces expériences peuvent être envisagées comme la reproduction fidèle des phénomènes correspondant dans le sol.

Le silico-gel comme véhicule de la substance nutritive a l'avantage de ne gêner en rien les dosages chimiques. Pour l'analyse, il n'y a qu'à mettre la soucoupe avec le gel sur la plaque métallique de l'étuve de Roux, et, au bout de vingt-quatre heures, le gel est réduit à une petite masse de graviers ou sables, qui sont employés intégralement pour le dosage par la méthode de Kjeldahl, ou traités par de l'eau chaude pour le dosage des nitrates.

Ces dosages donnent des résultats assez constants, comme rendement, ce qui permet d'espérer que le procédé, si simple et si rapide, pourra servir à comparer les pouvoirs fixateurs et nitrificateurs des différentes terres avec plus de sûreté et de rapidité qu'on ne l'a fait jusqu'à ce jour. Des expériences dans cette direction sont en train.

# RECHERCHES SUR LA SOI-DISANT RÉVERSIBILITÉ DES ACTIONS DIASTASIQUES

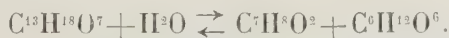
## HYDROLYSE TOTALE DE LA SALICINE PAR L'ÉMULSINE (1)

par MM. GABRIEL BERTRAND et A. COMPTON

22

Dans un mémoire important, publié en 1892, Tammann est arrivé à cette conclusion, devenue classique, que les hydrolyses dues aux diastases ne sont jamais complètes, contrairement à celles produites par les acides. Ainsi, en faisant agir l'émulsine sur la salicine en solution à 3 p. 100, il n'a pu arriver à transformer plus de 94,5 p. 100 du glucoside en saligénine et glucose. Tammann explique cette différence, qui, d'après lui, serait fondamentale, en supposant que les diastases sont transformées par les produits de la décomposition hydrolytique en des modifications inactives (2).

Aujourd'hui, on interprète plus généralement ces faits en admettant que les hydrolyses diastasiques sont des réactions réversibles. Il en résulterait, dans le cas spécial de la salicine, qu'en faisant agir l'émulsine sur un mélange équimoléculaire de saligénine et de glucose, on devrait obtenir après quelque temps, par déshydratation, environ 5,5 de glucoside



L'expérience a été tentée, en 1905, par Visser, mais n'a donné, à notre sens, qu'un résultat douteux (3).

Dans un travail plus récent, Bourquelot et Bridel ont publié une expérience analogue à celles de Tammann. Ils ont constaté

(1) Ce mémoire est le développement d'une note présentée à l'Académie des sciences dans la séance du 10 juin 1912 (154, p. 1646). Par suite de circonstances indépendantes de notre volonté, il n'avait pu être publié. Nous le donnons tel qu'il avait été rédigé à cette époque.

(2) *Zeits. physiolog. Chem.*, **16**, 1892, p. 271.

(3) *Zeits. physik. Chem.*, **52**, 1905, p. 257.



qu'une solution de 100 cent. cubes de salicine au centième additionnée de 0 gr. 200 d'émulsine et qui accusait, dans un tube de 2 décimètres de longueur, une rotation de  $-1^{\circ}18$ , était devenue, après dix jours et d'une manière définitive, égale à  $+0^{\circ}33$ . Ayant calculé que la rotation aurait dû être de  $+0^{\circ}39$  si l'hydrolyse avait été complète, ils ont admis que l'émulsine n'avait pu hydrolyser, dans leur expérience, que 94,87 p. 100 de la salicine mise en œuvre (1).

Aucune des expériences que nous venons de rapporter ne nous paraît suffisante pour faire admettre d'une manière définitive, soit la différence supposée entre l'action des diastases et celle des acides, soit la réversibilité de l'hydrolyse diastasique de la salicine.

Si, en effet, on examine avec soin le mémoire de Tammann, on est frappé par la précision excessive des résultats expérimentaux destinés à fournir la preuve de l'arrêt hydrolytique. Un tel degré de précision est impossible à atteindre et oblige à n'accepter qu'après vérification les expériences, d'ailleurs réalisées par un élève, qui ont servi de base aux considérations théoriques de Tammann.

Quant à l'expérience de Bourquelot et Bridel, elle ne pourrait avoir de valeur démonstrative que s'il était démontré que la petite différence de lecture polarimétrique de  $0^{\circ}06$  était hors de toute erreur, basée tout au moins sur des pouvoirs rotatoires exacts dans les conditions de température et de concentration de l'expérience et, de plus, non influencée par la présence des corps introduits avec la diastase.

Nous avons étudié l'hydrolyse diastasique de la salicine en prenant toutes les précautions suggérées par la critique. Nous nous sommes assurés, tout d'abord, de la pureté du glucoside. Celui-ci a été recristallisé dans l'eau à plusieurs reprises, jusqu'à pouvoir rotatoire constant qui était, à la concentration de 3 p. 100 et à la température de  $+20$  degrés, de  $\alpha_D = -62^{\circ}6$ . Nous avons mesuré la proportion de glucose mis en liberté d'après le pouvoir réducteur à l'aide de la méthode décrite antérieurement par l'un de nous (2) et après nous être assurés que la

(1) *Comptes rendus de l'Acad. des sciences*, **154**, 1912, p. 944.

(2) GABRIEL BERTRAND, *Bull. Soc. chim.*, 3<sup>e</sup> série, **35**, 1906, p. 1285.

diastase introduite et la saligénine formée n'avaient sur la précipitation de l'oxydure de cuivre, comme on le verra plus loin, qu'une influence insignifiante ou fort petite, que nous avons d'ailleurs mesurée. Enfin, nous avons éliminé les causes d'erreur dans les mesurages en nous servant de pipettes et de matras jaugés, vérifiés par nous à la balance et en opérant toujours les mesures sur des volumes suffisants pour atteindre une approximation d'environ un millième.

Les expériences ont porté sur des solutions voisines de 1, de 3 et de 6 p. 100 en salicine (1). La solution à 3 p. 100 est presque saturée à la température ordinaire; celle à 6 p. 100 n'a été possible qu'à la température voisine de  $+42$  degrés, à laquelle s'est produite l'action diastasique.

*EXPÉRIENCES à la concentration voisine de 1 p. 100 en salicine.* — On a d'abord préparé une certaine quantité de solution renfermant 0 gr. 209 de glucoside par 10 cent. cubes et, une heure avant de faire les mélanges, une solution contenant soit 0 gr. 002, soit 0 gr. 010 d'émulsine par centimètre cube. Dans une série de tubes en verre d'Iéna, on a versé alors 10 cent. cubes de solution de salicine, une quantité variable d'émulsine et l'on a complété le volume de 20 cent. cubes avec de l'eau pure. Avant les expériences, les tubes, bien nettoyés, ont été passés à la vapeur et séchés. L'eau a été purifiée par une double distillation, dont la seconde sous pression réduite, dans un appareil en verre.

Une fois préparés et bouchés, les tubes ont été mis dans un bain-marie réglé au dixième de degré, soit, dans certaines séries d'expériences, pendant 15 heures à la température de  $+35^{\circ}5$ , soit, dans d'autres séries, 2 heures seulement à la température de  $+54^{\circ}5$  (2). Lorsque le temps voulu était écoulé, on refroidissait rapidement les tubes dans l'eau glacée, puis on y ajoutait 11 gouttes de soude normale, ce qui arrêtait aussitôt l'action diastasique. Le dosage du sucre réducteur a été effectué directement sur la moitié du liquide ou, après dilution à 50 cent. cubes, sur une portion aliquote, en général 20 cent. cubes.

La quantité de diastase a varié dans ces expériences de 0 milligr. 5 à 20 milligrammes lorsque l'hydrolyse était prolongée 15 heures et de 2 à 45 milligrammes lorsque l'hydrolyse durait seulement 2 heures.

Voici les proportions de salicine dédoublée p. 100 de salicine présente dans les 6 séries d'expériences que nous avons faites à la concentration voisine de 1 p. 100 en glucoside.

(1) Afin de permettre des comparaisons plus exactes avec des recherches antérieures déjà nombreuses, nous avons pris des proportions de salicine légèrement supérieures à 1,3 et 6 p. 100, par exemple 209 milligrammes au lieu de 200, et ainsi de suite.

(2) Ce n'est pas arbitrairement que nous avons choisi ces conditions de durée et de température : elles correspondent, d'après les recherches particulières que nous avons entreprises, à l'activité maxima de la diastase utilisée.

EXPÉRIENCES DE 15 HEURES A  $+ 35^{\circ}5$ .

DIASTASE en milligrammes	P. 100 DE SALICINE DÉDOUBLÉE		
	Série 1	Série 2	Série 3
0,5 . . . . .	"	27,7	"
1,0 (1,03) . . . . .	"	47,1	"
2,0 (1,95) . . . . .	"	71,5	"
2,5 . . . . .	"	"	82,3
3,0 . . . . .	83,8	83,9	"
4,0 . . . . .	90,0	"	88,8
5,0 . . . . .	90,9	"	"
6,0 . . . . .	"	96,3	"
7,5 . . . . .	"	"	97,9
9,0 . . . . .	"	99,9	"
10,0 . . . . .	"	"	100,0
12,0 . . . . .	"	98,1	"
12,5 . . . . .	"	"	101,1
15,0 . . . . .	"	"	99,1
20,0 . . . . .	"	"	100,0

EXPÉRIENCES DE 2 HEURES A  $+ 54^{\circ}5$ .

DIASTASE en milligrammes	P. 100 DE SALICINE DÉDOUBLÉE		
	Série 4	Série 5	Série 6
2 . . . . .	26,0	"	"
4 . . . . .	43,9	"	"
5 . . . . .	52,9	"	"
6 . . . . .	59,6	"	"
8 . . . . .	69,3	"	"
10 . . . . .	"	77,4	"
14 . . . . .	"	87,9	"
18 . . . . .	"	93,2	"
22 . . . . .	"	95,5	"
25 . . . . .	"	"	98,5
26 . . . . .	"	98,1	"
30 . . . . .	"	93,0	99,5
35 . . . . .	"	"	100,4
40 . . . . .	"	"	100,4
45 . . . . .	"	"	95,5

EXPÉRIENCES à la concentration voisine de 3 p. 100 en salicine. — Dans ces expériences a salicine a été pesée chaque fois et introduite directement dans les tubes. On en a pris 0 gr. 617 que l'on a dissous dans 10 cent. cubes d'eau en chauffant un peu au bain-marie, car, à la température ordinaire, la salicine n'est soluble qu'à raison de 3,5 p. 100 environ. On a ramené la température de la solution à  $+ 57$  degrés; on a ajouté ensuite la diastase, préalablement dissoute dans la proportion de 0 gr. 020 par centimètre cube et l'on a complété le volume de 20 cent. cubes avec de l'eau pure. On a mis fin aux expériences comme il a été indiqué plus haut; la solution a été diluée à 100 cent. cubes, et l'on a fait le dosage du sucre réducteur sur un dixième du volume.

Voici les chiffres obtenus :

EXPÉRIENCES DE 2 HEURES A  $+53$  DEGRÉS.

DIASTASE en milligrammes	P. 100 DE SALICINE DÉDOUBLÉE	
	Série 7	Série 8
10 . . . . .	61,8	»
20 . . . . .	72,0	»
30 . . . . .	84,1	»
40 . . . . .	91,8	»
45 . . . . .	»	93,8
50 . . . . .	»	93,0
60 . . . . .	»	96,6
80 . . . . .	»	96,6
100 . . . . .	»	95,8
120 . . . . .	»	97,3
150 . . . . .	99,9	»

EXPÉRIENCES à la concentration voisine de 6 p. 100 en salicine. — Comme dans les dernières séries d'expériences, on a dissous chaque fois la quantité nécessaire de salicine, ici 1 gr. 254, dans 10 cent. cubes d'eau, en chauffant un peu au bain-marie. La solution obtenue a été mise en équilibre de température dans le bain réglé à  $+41^{\circ}6$ , puis on a ajouté la solution diastasique et l'eau complémentaire. Pendant la première heure d'action, on a agité souvent les tubes. A la fin, après avoir refroidi, on a mis II gouttes de soude normale dans les tubes contenant jusqu'à 100 milligrammes de diastase et III gouttes dans ceux qui en renfermaient davantage. On a dilué les solutions à 200 cent. cubes, et fait les dosages sur 20 cent. cubes de la dilution.

Les résultats ont été les suivants :

EXPÉRIENCES DE 15 HEURES A  $+41^{\circ}6$ .

DIASTASE en milligrammes	P. 100 DE SALICINE DÉDOUBLÉE	
	Série 9	Série 10
5 . . . . .	55,4	»
10 . . . . .	75,6	»
20 . . . . .	90,4	»
30 . . . . .	94,5	»
40 . . . . .	95,8	»
50 . . . . .	97,2	»
75 . . . . .	97,8	»
100 . . . . .	99,2	»
125 . . . . .	»	99,9
150 . . . . .	»	99,7
200 . . . . .	»	99,0

Le degré de précision des expériences ci-dessus peut atteindre facilement 1 p. 100 et même 1/2 p. 100 dans les cas où la quantité de diastase ne dépasse guère 20 à 25 milligrammes ; dans les autres, il y a lieu de tenir compte d'une petite erreur



en moins s'élevant d'environ  $1/4$  à 1 p. 100, lorsque la dose de diastase passe de 50 à 200 milligrammes. C'est du moins ce que l'on peut déduire des séries d'expériences de contrôle suivantes, dans lesquelles on a soumis à la méthode de dosage une même quantité de glucose, soit pur, soit additionné de diastase, de saligénine, ou d'un mélange de diastase et de saligénine.

PREMIÈRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES DE CONTRÔLE. Les quantités de glucose et de saligénine employées dans ces expériences étaient équimoléculaires; on a fait chaque dosage en double sur 10 cent. cubes de mélange.

	COMPOSITION des mélanges		VOLUME de $\text{KMnO}_4$ versé (l)	GLUCOSE total correspondant
a) Glucose . . . .	394,5 mg.	{	7,65 c. c.	394 mg.
Eau . . . . .	100 c. c.		7,70 c. c.	397 mg.
b) Glucose . . . .	394,5 mg.	{	7,75 c. c.	400 mg.
Saligénine . . . .	272 » mg.		7,65 c. c.	394 mg.
Eau . . . . .	100 c. c.			
c) Glucose . . . .	394,5 mg.	{	7,65 c. c.	394 mg.
Diastase . . . .	150 » mg.		7,35 c. c.	389 mg.
Eau . . . . .	100 c. c.			
d) Glucose . . . .	394,5 mg.	{	7,60 c. c.	392 mg.
Saligénine . . . .	272 » mg.		7,60 c. c.	392 mg.
Diastase . . . .	150 » mg.			
Eau . . . . .	100 c. c.			
e) Diastase . . . .	150 » mg.	{	0,10 c. c.	0 mg.
Eau . . . . .	100 c. c.			

DEUXIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES DE CONTRÔLE, servant à mesurer l'influence de quantités croissantes de diastase sur le dosage du pouvoir réducteur. Dans ces expériences, le glucose et la diastase ont été dissous dans 200 cent. cubes d'eau et l'on a fait les dosages sur 20 cent. cubes.

	COMPOSITION des mélanges		VOLUME de $\text{KMnO}_4$ versé	GLUCOSE total correspondant
a) Glucose . . . .	779,5 mg.	{	14,25 c. c.	778 mg.
Eau . . . . .	200 c. c.		14,30 c. c.	781 mg.
b) Glucose . . . .	779,5 mg.	{	14,10 c. c.	769 mg.
Diastase . . . .	100 » mg.		14,05 c. c.	766 mg.
Eau . . . . .	200 c. c.		14,25 c. c.	778 mg.
c) Glucose . . . .	779,5 mg.	{	14,15 c. c.	772 mg.
Diastase . . . .	250 » mg.		14,05 c. c.	766 mg.
Eau . . . . .	200 c. c.			
d) Glucose . . . .	779,5 mg.	{	14,05 c. c.	767 mg.
Diastase . . . .	500 » mg.		14,05 c. c.	767 mg.
Eau . . . . .	200 c. c.			

(1) Un cent. cube équivalant à 10 milligrammes de cuivre précipité par le glucose.

TROISIÈME SÉRIE D'EXPÉRIENCES DE CONTRÔLE, analogue à la précédente.

	COMPOSITION des mélanges	VOLUME de $\text{KMnO}_4$ versé	GLUCOSE total correspondant
a) Glucose . . . . .	755 » mg.	} 13,85 c. c.	753 mg.
Eau . . . . .	200 c. c.		756 mg.
b) Glucose . . . . .	755 » mg.	} 13,80 c. c.	751 mg.
Diastase . . . . .	125 » mg.		753 mg.
Eau . . . . .	200 c. c.		
c) Glucose . . . . .	755 » mg.	} 13,90 c. c.	756 mg.
Diastase . . . . .	200 » mg.		753 mg.
Eau . . . . .	200 c. c.		

Ainsi, le glucoside a été dédoublé entièrement en saligénine et en glucose, quelle qu'ait été la concentration de sa solution aqueuse. En opérant sur 20 cent. cubes, il a suffi pour atteindre ce résultat :

De 9 milligrammes de diastase agissant 15 heures sur la solution à 1 p. 100, à la température de  $+35^{\circ}\text{S}$  ;

De 30 à 35 milligrammes de diastase agissant 2 heures sur la solution à 1 p. 100, à la température de  $+54^{\circ}\text{S}$  ;

De 150 milligrammes environ de diastase agissant 2 heures sur la solution à 3 p. 100, à la température de  $+53$  degrés ;

Et même d'environ 125 milligrammes seulement de diastase agissant 15 heures sur la solution à 6 p. 100, à la température de  $+41^{\circ}\text{S}$ .

Il n'est pas douteux que l'on puisse encore obtenir un dédoublement complet à des concentrations plus grandes. Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons fait réagir 200 milligrammes de diastase à la température de  $+41^{\circ}\text{S}$ , sur 1 gr. 254 de salicine en présence de 6 cent. cubes d'eau, quantité insuffisante pour dissoudre le glucoside. Nous avons préparé 3 tubes semblables et, de temps en temps, nous avons dosé le sucre réducteur sur le contenu total d'un tube. Comme nous agitions souvent les mélanges pendant la réaction, le liquide est resté saturé de salicine presque jusqu'à la fin, c'est-à-dire jusqu'au moment où 20 p. 100 de son poids en glucoside a été dissous. Pour éviter l'influence des microbes, nous avons ajouté 7 gouttes de toluène dans chaque tube ; la saligénine formée a augmenté dans la suite le pouvoir antiseptique du milieu. Nous avons trouvé :

DURÉE DE L'EXPÉRIENCE	P. 100 DE SALICINE DÉDOUBLÉE
15 heures. . . . .	84,5
45 — . . . . .	97,3
90 — . . . . .	97,8

C'est-à-dire que, malgré la haute concentration, la salicine a été déjà presque complètement dédoublée le quatrième jour.

Nous avons acquis de nouvelles preuves que l'action hydrolysante de la diastase n'est pas arrêtée par les produits de dédoublement de la salicine dans les conditions de concentration en glucoside où s'étaient placés Tammann et, à plus forte raison sans doute, Bourquelot et Bridel; qu'il n'y a, par conséquent, pas d'équilibre lorsque l'hydrolyse atteint environ 95 centièmes, en ajoutant, à une solution équimoléculaire de saligénine et de glucose correspondant à une solution entièrement dédoublée de glucoside à 3 p. 100, une très petite quantité de salicine (1 millième 1/2 dans une expérience et 3 millièmes dans une autre) et en faisant agir sur le tout 150 milligrammes de diastase. Après deux heures, à la température de + 53 degrés, la salicine ajoutée a été hydrolysée comme si elle avait été seule, ainsi qu'en témoignent les chiffres suivants :

	COMPOSITION des mélanges	VOLUME de $\text{KMnO}_4$ employé	GLUCOSE total correspondant	GLUCOSE total calculé
a) Saligénine. . .	272 » mg.	7,55 c.c.	389 mg.	»
Glucose. . . .	394,5 mg.			
Diastase. . . .	150 » mg.			
Eau . . . . .	20 c.c.			
b) Saligénine. . .	272 » mg.	7,90 c.c.	408 mg.	408,7 mg.
Glucose. . . .	394,5 mg.			
Salicine . . . .	31,3 mg.			
Diastase. . . .	150 » mg.			
Eau . . . . .	20 c.c.			
c) Saligénine. . .	272 » mg.	8,40 c.c.	436 mg.	428,4 mg.
Glucose. . . .	394,5 mg.			
Salicine . . . .	62,7 mg.			
Diastase. . . .	150 » mg.			
Eau . . . . .	20 c.c.			

Dans ces expériences, le contenu des tubes avait été amené à 400 cent. cubes et l'on avait opéré le dosage sur 1/10 du volume. La concordance entre les résultats calculés et les résultats trouvés est donc aussi bonne que possible.

Enfin, nous avons essayé si, en laissant des mélanges équi-

moléculaires de saligénine et de glucose en présence de diastase, il y avait un retour partiel au glucoside, comme l'exige la théorie de l'hydrolyse limitée par un équilibre.

Dans une première série d'expériences, chaque tube contenait 272 milligrammes de saligénine, 394 milligrammes de glucose, 150 milligrammes de diastase, 20 cent. cubes d'eau et V gouttes de toluène. On a fait les dosages sur  $\frac{1}{5}$  du volume amené à 100 cent. cubes, soit immédiatement, soit après séjour au bain réglé à  $+53$  degrés; on a obtenu comme résultats :

DURÉE de l'expérience.	VOLUME de $\text{KMnO}_4$ employé.	GLUCOSE total correspondant.
Nulle (expérience témoin). . .	14,20 c.c.	387,5 mg.
— . . . . .	14,15 c.c.	386,0 mg.
24 heures . . . . .	14,05 c.c.	383,0 mg.
— . . . . .	14,00 c.c.	381,0 mg.
50 heures . . . . .	14,15 c.c.	386,0 mg.
— . . . . .	14,20 c.c.	387,5 mg.
70 heures . . . . .	13,90 c.c.	378,0 mg.
— . . . . .	14,00 c.c.	381,0 mg.

S'il s'était formé 5 à 6 p. 100 de salicine, on n'aurait dû trouver que de 367 à 364 milligrammes de glucose total.

Dans une seconde série d'expériences les quantités de saligénine, 544 milligrammes, et de glucose, 789 milligrammes, dissoutes dans 2 cent. cubes d'eau seulement représentaient une concentration en glucoside de 60 p. 100; on les a fait réagir, pendant 48 heures, à la température de  $+41^\circ\text{S}$ , en présence de 200 milligrammes de diastase, avec ou sans addition de V gouttes de toluène. Les dosages ont été effectués sur  $\frac{1}{10}$  du volume après dilution à 100 cent. cubes. On a trouvé :

NATURE de l'expérience.	VOLUME de $\text{KMnO}_4$ employé.	GLUCOSE total correspondant.
Témoin avec toluène . . . . .	14,55 c.c.	796,0 mg.
— . . . . .	14,35 c.c.	784,0 mg.
Témoin sans toluène . . . . .	14,40 c.c.	787,0 mg.
— . . . . .	14,55 c.c.	796 mg.
Après 48 heures avec toluène .	14,45 c.c.	790 mg.
— . . . . .	14,40 c.c.	787 mg.
Après 48 heures sans toluène .	14,40 c.c.	787 mg.
— . . . . .	14,45 c.c.	790 mg.

Ici encore, il n'y a pas eu de retour appréciable des produits



de dédoublement de la salicine à la forme de glucoside, sous l'influence de la diastase.

Il est donc permis de soutenir, à la suite de toutes ces expériences concordantes, qu'à la condition d'opérer dans de bonnes conditions d'activité diastasique, la salicine est complètement hydrolysée par l'émulsine des amandes, même à des concentrations très supérieures à celles qui peuvent se rencontrer dans les plantes.

Il n'y a pas lieu, par conséquent, d'admettre comme démontrées ni la différence fondamentale, créée par Tammann, entre l'action de cette diastase et celle des acides, ni, d'autre part, l'existence d'un équilibre dû à une transformation inverse dans l'hydrolyse diastasique de la salicine.

# RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT

## MÉTHODE RAPIDE

### APPLIQUÉE AU DIAGNOSTIC DE LA TUBERCULOSE

par J. VALTIS.

Dans un récent mémoire, Mutermilch (1) a donné une technique du séro-diagnostic de la syphilis utilisée par lui à l'Institut Pasteur depuis plusieurs années.

D'après les expériences de contrôle effectuées par la conférence sérologique de Copenhague, cette technique a donné, dans les cas de syphilis avérée, un nombre de résultats positifs plus élevé que les méthodes préconisées par les autres chercheurs.

Nous nous sommes proposé de l'appliquer au diagnostic de la tuberculose en utilisant *l'antigène méthylique de Boquet et Nègre* (2).

La technique que nous avons employée est la suivante :

Nous prenons pour chaque réaction six tubes à hémolyse, divisés en deux séries de trois.

La première sert pour la réaction de fixation, et la seconde, qu'on dispose de préférence derrière la première série, est destinée à déterminer l'index hémolytique du sérum à examiner (Weinberg) (3). Une troisième série de trois tubes est réservée à la réaction de Wassermann selon la méthode de Mutermilch.

Les deux premiers tubes de la première série reçoivent respectivement 0,5 et 1 cent. cube d'antigène méthylique dilué au 1/20 avec de l'eau physiologique et 0,1 du sérum à examiner, *non inactivé par chauffage*, et ne datant pas de plus de quarante-huit heures. On complète le volume du premier tube à 1 c. c. 1 en ajoutant 0,5 d'eau physiologique.

(1) Ces *Annales*, 38, n° 9, septembre 1924.

(2) Déjà Goldenberg en employant une méthode rapide, mais compliquée, a montré que l'on pouvait déceler les anticorps tuberculeux en présence de l'antigène à l'œuf de Besredka. *C. R. Soc. de Biologie*, séance du 28 janvier 1922, p. 192).

(3) Ces *Annales*, 1912, p. 424.

Le troisième tube, qui sert de témoin, reçoit 0,1 de sérum frais à examiner et 1 cent. cube d'eau physiologique.

Chacun des trois tubes de la seconde série, qui servira pour la détermination de l'index hémolytique, reçoit tout d'abord 0,1 de sérum frais à examiner. Puis on ajoute dans chacun de ces derniers tubes respectivement 0,3, 0,6 et 0,9 d'émulsion d'hématies de mouton à 5 p. 100.

On agite et on porte à l'étuve à 37° pendant une heure et demie. On ajoute ensuite aux trois premiers tubes des quantités d'hématies de mouton, variables selon que l'index hémolytique est fort ou faible.

Si 0,1 de sérum humain frais n'hémolyse que 0,3 d'hématies de mouton au maximum, on ajoutera, à la fin de la réaction, à chacun des trois premiers tubes, 0,1 d'hématies de mouton au 1/20.

Si 0,1 du même sérum hémolyse 0,6 de globules (index hémolytique égale 6), on ajoutera 0,2 d'hématies aux trois premiers tubes.

Si enfin 0,1 du sérum humain hémolyse 0,9 de globules, on ajoutera aux tubes de la réaction le tiers, soit 0 c. c. 3 d'hématies de mouton.

Après avoir agité les tubes additionnés de la quantité convenable de globules rouges, on les porte à l'étuve à 37° pendant une demi-heure.

Au bout de ce temps, si le contenu des deux premiers tubes n'est pas hémolysé, tandis que le troisième (tube témoin) est hémolysé, la réaction doit être considérée comme *fortement positive*. Elle doit être considérée comme *positive* s'il y a hémolyse dans le premier et le troisième tube, et non dans le deuxième. Enfin, elle est *négative* si l'hémolyse s'est produite dans les trois tubes.

Il arrive parfois (dans 12 p. 100 des cas) que l'hémolyse ne se produise dans aucun des tubes de la deuxième série. Cela signifie que l'index hémolytique est inférieur à 3, c'est-à-dire que le sérum ne renferme pas assez d'alexine normale (cas assez fréquent), ou de sensibilisatrice normale anti-mouton, soit de l'une et de l'autre, pour la quantité de globules rouges employée.

Cette proportion peut être ramenée à 5 p. 100 selon Muter-milch, étant donné que la plus grande partie des sérums qui n'ont aucun pouvoir hémolytique vis-à-vis de 0,3 de globules de

mouton sont cependant doués d'un pouvoir hémolytique suffisant pour dissoudre au moins 0,1 des mêmes hématies.

On continue donc l'examen en ajoutant 0,1 de globules rouges dans les trois tubes de la réaction.

Lorsque le pouvoir hémolytique du sérum est nul, on est obligé de recourir à la réaction de fixation au moyen du sérum inactivé de MM. Calmette et Massol.

Nous avons appliqué cette méthode à 80 sérums qui ont été simultanément examinés par la méthode classique de MM. Calmette et Massol. Une réaction de Wassermann a été faite pour chaque sérum.

Sur 39 malades *tuberculeux avérés*, l'index hémolytique a été inférieur à 3 dans un cas. Sur les 38 restants, la réaction de fixation a été positive avec la méthode Calmette-Massol dans 30 cas, soit 78,9 p. 100, et avec la méthode que nous avons décrite dans 32 cas, soit 84,4 p. 100.

Aucun de ces sérums n'a présenté de Wassermann positif.

Sur 41 malades non tuberculeux, l'index hémolytique a été inférieur à 3 dans 9 cas. Sur les 32 restants, 2 ont eu un Wassermann positif et ont également fixé le complément avec l'antigène tuberculeux.

Sur 30 restants, la réaction a été positive dans 4 cas avec la méthode Calmette et Massol, soit 13,6 p. 100, et dans 5 cas avec la méthode ci-dessus décrite, soit 16,7 p. 100.

Nous pensons que, par sa simplicité, cette méthode peut rendre des services en facilitant beaucoup les opérations quand on doit procéder à un grand nombre d'examens.

Le seul inconvénient que l'on puisse lui reprocher est de ne pas permettre le titrage des anticorps aussi exactement que cela est possible avec la méthode de Calmette-Massol.

Cependant, au cours de nos recherches, nous avons pu nous rendre compte que la fixation de l'alexine dans les deux premiers tubes de la réaction précédente correspond à 4 doses d'alexine (et au-dessus) de la méthode Calmette et Massol, et que la déviation de l'alexine dans le deuxième tube seulement correspond à deux et trois doses d'alexine de la méthode classique.

(Laboratoire de M. le professeur Calmette,  
à l'Institut Pasteur.)



# FLOCCULATION DES SÉRUMS ANTIMÉNINGOCOCCIQUES EN PRÉSENCE D'EXTRAITS ALCOOLIQUES DE MÉNINGOCOQUES

par DUJARRIC DE LA RIVIÈRE et ÉTIENNE ROUX

## I

L'agglutination et la déviation du complément sont actuellement les deux méthodes les plus employées pour le titrage des sérums antiméningococciques. A la vérité on les emploie faute de mieux, car on chercherait vainement dans la littérature scientifique des faits qui, par exemple, établiraient d'une façon précise, pour un même sérum, une concordance entre la valeur thérapeutique et le taux d'agglutination ou de déviation du complément. C'est également la conclusion de l'étude expérimentale et clinique que nous avons faite, durant ces cinq dernières années, de nombreuses origines de sérums antiméningococciques.

Si l'on s'en tient malgré tout à ces méthodes, c'est parce que l'inoculation à l'animal — si précieuse pour le dosage des toxines ou pour celui des sérums antitoxiques — n'est ici d'aucun secours. Persuadés qu'on ne posséderait une méthode précise de dosage que le jour où l'on pourrait déterminer la dose minima mortelle de méningocoque capable de tuer l'animal dans un délai constant et la dose de sérum nécessaire pour la combattre, nous avons pratiqué de nombreuses inoculations aux animaux de laboratoire (cobaye, rats, souris, lapins, oiseaux). Nous avons multiplié les conditions de l'expérience : culture des souches de méningocoques sur les milieux les plus divers — présentations variables du produit injecté : cultures émulsionnées, filtrat de cultures, toxines préparées suivant les procédés de Kraus et Doerr, de Gordon — voies d'inoculation diverses (peau, péritoine, veine).

Sans doute, beaucoup d'animaux inoculés succombent; il est facile d'imaginer, par comparaison avec celles employées pour

d'autres sérums, des méthodes de dosage, — et nous les avons plusieurs fois réalisées — qui détermineraient par exemple jusqu'à quel taux de dilution un sérum à l'étude empêche la mort de l'animal. Mais avec le méningocoque une pareille méthode de dosage n'aurait qu'une valeur apparente. En réalité, si on inocule beaucoup d'animaux, si on les suit pendant longtemps, on est bien obligé de reconnaître que leur sensibilité à l'infection méningococcique est très variable. Si on inocule des cobayes avec une même origine de méningocoque — ceux qui ont reçu du sérum ayant résisté à l'injection —, il existe toujours parmi les témoins un nombre important d'individus qui résistent sans avoir reçu de sérum; pour une même origine microbienne, le temps au bout duquel les animaux succombent est très différent suivant les sujets. Il y a encore d'autres variantes et on peut affirmer qu'actuellement aucune méthode d'inoculation à l'animal ne donne de résultats *suffisamment constants* pour permettre de baser sur elle un procédé précis de dosage.

Le mieux serait évidemment de reconnaître que nous ne disposons encore d'aucun procédé valable de dosage des sérums antiméningococciques. Mais, à l'étranger, on continue à exiger, pour admettre ces sérums, qu'ils possèdent un taux déterminé d'agglutination ou de déviation du complément. Or, pour les nombreuses déviations du complément que nous avons à pratiquer, nous étions arrivés à substituer à l'émulsion de corps microbiens ordinairement employée (et qu'il faut chaque fois préparer) un antigène alcoolique (pouvant servir très longtemps) obtenu par macération de corps microbiens dans l'alcool suivant une technique que nous indiquerons plus loin.

Lorsque, par la suite, nous avons constaté, en étudiant une réaction de flocculation pour le diagnostic de la syphilis (1), que l'addition à l'antigène alcoolique de Bordet et Ruelens d'une quantité déterminée de teinture de benjoin (2) permettait

(1) Ces *Annales*, février 1925.

(2) Le benjoin a pour but de rendre le phénomène macroscopique en déterminant l'apparition de gros flocculats faciles à voir. Nous reprendrons ici volontiers la comparaison faite avec l'action des ions qui dans l'atmosphère, ou dans des brouillards artificiellement formés (expériences de Rutherford et de Millikan), provoquent des phénomènes de condensation, sortes de noyaux électrisés attirant des molécules de vapeur d'eau.

d'obtenir, avec les sérums syphilitiques, une floculation facile à réaliser et à interpréter, se produisant suivant un rythme régulier, nous avons entrepris des recherches pour savoir s'il serait possible d'établir une méthode comparable pour les sérums méningococciques et c'est le résultat de ces premières recherches que nous apportons aujourd'hui (1).

## II. — Technique.

### A. — PRÉPARATION DES RÉACTIFS.

1° *Extraits alcooliques de méningocoques* : Pour préparer cet extrait alcoolique, on émulsionne, dans 100 cent. cubes d'alcool absolu (l'alcool à 95 peut suffire et on peut employer l'alcool méthylique), les colonies de méningocoques qui ont poussé sur 5 boîtes de Roux. Il s'agit ici d'une culture de 24 heures sur gélose ordinaire à 3 p. 100; nos germes étant habitués à pousser sur ce milieu, les cultures sont abondantes. Après avoir enlevé l'eau de condensation, on verse dans chaque boîte 20 cent. cubes d'alcool; avec une pipette ou un fil métallique, recourbés à leur extrémité et stérilisés, on racle doucement la culture en ayant soin de ne pas entamer la gélose (c'est à dessein que nous employons une gélose à 3 p. 100). On réunit dans un flacon bien propre, préalablement rincé à l'alcool, le liquide d'émulsion des 5 boîtes. On laisse au contact, à l'obscurité, pendant 1 mois; on agite fréquemment. Au bout de ce temps on filtre sur papier; le filtrat, parfaitement clair, constitue l'antigène méningococcique. Il conserve longtemps ses propriétés; nous utilisons encore certains de ces antigènes que nous avons préparés il y a trois ans. Nous avons préparé par ce procédé des antigènes méningococciques A, B, C et D, correspondant aux variétés actuellement connues des méningocoques.

2° *Teinture de benjoin* : Un gramme de résine de benjoin de Sumatra, finement pulvérisée, est mise au contact avec 10 cent. cubes d'alcool absolu; on laisse macérer pendant

(1) Voir C. R. *Société de Biologie*, 12 janvier 1924, 10 mai 1924, 12 juillet 1924.

48 heures; on *filtre sur papier* (filtrer et non décantier) pour avoir une liqueur absolument limpide.

## B. — TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

1° Dans un tube à essai *parfaitement propre et sec* on mélange en proportions convenables (nous allons les indiquer) l'antigène méningococcique et la teinture de benjoin. Nous appelons ce mélange : *mélange initial*.

Nous avons tout d'abord indiqué, pour le mélange initial, la proportion de quatorze parties d'antigène pour une de benjoin parce que nous avons pris pour la réaction la dose minima non flocculante. Nous faisons, du reste, remarquer qu'il n'y aurait aucun inconvénient à employer un mélange initial contenant une dose plus forte de benjoin et qui flocculerait en présence de l'eau physiologique avant l'addition du sérum, car, si un sérum positif intensifie la flocculation, *un sérum négatif jouit de la remarquable propriété de faire redevenir absolument homogène un mélange qui flocculait spontanément*. Aussi avons-nous pris pour nos expériences le mélange initial au sixième (4 benjoin, 5 antigène) qui floccule spontanément, mais se montre plus sensible à l'action des sérums positifs. Ce taux a été valable pour tous les antigènes méningococciques que nous avons préparés.

2° Dans des tubes (tubes de 22 ou de 46) *propres et secs*, on verse dans l'ordre suivant (la constitution des émulsions est différente suivant que l'on met le mélange initial avant ou après l'eau) : 1/10 de cent. cube du mélange initial, puis 5 cent. cubes d'eau physiologique à 8,5 p. 1.000, et enfin 1 cent. cube de sérum antiméningococcique *non chauffé*. Possédant toujours des sérums expérimentaux en quantité suffisante (à l'inverse de ce qui se passe souvent pour les sérums syphilitiques), nous avons pris l'habitude de doubler les doses respectives des réactifs, car, la colonne de liquide étant plus haute, les résultats sont d'une lecture encore plus facile.

Une émulsion, faite dans les mêmes conditions, et mise au contact de sérum normal, sert de témoin.

On met les tubes à l'étuve à 37° et on note le début de la flocculation dans les conditions que nous indiquerons plus loin.



## C. — REMARQUES.

1° Le sérum *ne doit pas avoir été chauffé*.

2° Il faut employer du benjoin *de Sumatra* à l'exclusion de tout autre.

3° Lorsqu'on emploie pour la première fois un antigène alcoolique, ou une teinture de benjoin, il faut éprouver leur valeur en présence d'un sérum antiméningococcique dont on connaît l'aptitude à flocculer.

## III. — Résultats.

## 1° SPÉCIFICITÉ DE LA RÉACTION.

*Un sérum normal ne floccule jamais en présence de notre mélange.* Nous avons essayé toutes les variétés de sérums thérapeutiques actuellement préparées par l'Institut Pasteur. *Seuls les sérums antiméningococciques flocculent en présence de l'antigène méningococcique.* Il y a spécificité d'espèce, mais il n'y a pas spécificité de variété. Un sérum A floccule plus fortement et plus vite en présence de l'antigène A, mais il floccule aussi plus ou moins en présence de l'antigène B ou C. Il y a des coflocculations, comme il y a des coagglutinations.

Depuis deux ans, nous avons essayé régulièrement tous nos sérums antiméningo par ce procédé. Nous avons fait porter sur quelques sérums seulement des recherches comparatives dont nous allons indiquer les résultats.

## 2° MESURE DU POUVOIR FLOCCULANT.

A. Dans une première série d'expériences, une quantité de sérum *fixe et égale* (2 cent. cubes) pour chaque origine de sérum est mise au contact de l'émulsion, dans 9 cent. cubes d'eau physiologique, de deux dixièmes du mélange initial constitué par une partie de teinture de benjoin et cinq parties d'antigène alcoolique correspondant à la variété du sérum en expérience (par exemple un sérum A est mis en présence d'un

TABLEAU I. — Chevaux en cours d'immunisation.

NUMÉRO DES CHEVAUX	VARIÉTÉ de méningocoques	TEMPS D'IMMUNISATION en jours	QUANTITÉ TOTALE d'émulsion reçue en centimètres cubes	ANTIGÈNE	SAIGNÉE du 8 juillet		SAIGNÉE du 10 juillet		SAIGNÉE du 12 juillet		SAIGNÉE du 15 juillet		SAIGNÉE du 17 juillet		SAIGNÉE du 19 juillet		SAIGNÉE du 22 juillet	
					Flocculation au début	Flocculation totale	Flocculation au début	Flocculation totale	Flocculation au début	Flocculation totale	Flocculation au début	Flocculation totale	Flocculation au début	Flocculation totale	Flocculation au début	Flocculation totale	Flocculation au début	Flocculation totale
460	A	80	245	A	H. m. 30	H. m. 4	H. m. 45	H. m. 2,30	H. m. 4	H. m. 5	H. m. 30	H. m. 1,30	H. m. 4	H. m. 1,30	H. m. 1,30	H. m. 2	H. m. 30	H. m. 1
467	A	70	140	A	45	2	45	1,30	6	7,30	45	2	4	2	1,30	2	45	1,30
461	B	80	255	B	45	1,45	45	1,30	5	7	30	1,45	2	4	1,15	1,45	1	1,30
462	B	80	285	B	45	45	4	1,30	5,30	8	30	1,30	4	2,30	30	45	30	1
464	B	70	185	B	1	3	3,30	5	5,30	9	1,45	3,30	3	4	1,30	2	1	2,30
465	B	70	185	B	45	1,30	1,30	2	5,30	8	1,30	2,30	30	1,45	45	1	1	1,30
463	C	80	260	C	2	3	2	3,30	4	8,30	2,30	5	2	4	1,15	1,45	1,15	1,45
469	C	70	220	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
466	B	70	185	B	1,15	1,45	1,30	2,30	5,30	10	3	4,15	1,30	2,15	1,15	1,45	1,15	1,45

antigène A). On met à l'étuve à 37°. La lecture est faite de quinze en quinze minutes pendant les trois premières heures, de trente en trente minutes pendant les trois heures suivantes, d'heure en heure jusqu'à la dixième heure; on note ensuite les résultats d'après dix-huit et vingt-quatre heures.

Pour la lecture des résultats, nous distinguons :

Apparition des premiers flocculats . . . . .	F+
Floculation à petits grains . . . . .	F++
Floculation à gros grains . . . . .	F+++
Réunion des flocculats en gros amas qui se déposent progressivement au fond du tube tandis que le liquide surnageant s'éclaircit . . . . .	FT (total).

Il suffit d'avoir vu une fois ces divers états physiques pour les distinguer très aisément (à l'œil nu, nous répétons qu'avec cette méthode la lecture n'exige l'aide d'aucun appareil d'optique).

Voici quelques résultats concernant une première série de chevaux qui étaient en voie d'immunisation. Pour ne pas compliquer, nous donnons seulement le temps d'apparition de la floculation (F+) et le moment où la floculation était complète (FT). Nous indiquons le temps d'immunisation et la quantité d'émulsion de méningocoques reçue (l'émulsion est faite à raison de 200 cent. cubes d'eau physiologique pour une boîte de Roux, culture de vingt-quatre heures; les chevaux reçoivent les microbes vivants). On a noté les résultats donnés par les sérums des mêmes chevaux au cours de saignées successives. (La dernière inoculation avait été faite aux chevaux le 6 juillet; la première saignée a été faite le 8.) [Voir tableau I.]

TABLEAU II.

NUMÉRO des chevaux	VARIÉTÉ de méningocoques	ANTIGÈNE	DÉRUT de la floculation
			H. m.
17. . . . .	A	A	15
18. . . . .	B	B	45
54. . . . .	A	A	1
76. . . . .	A	A	2
16. . . . .	B	B	1
151. . . . .	C	C	1, 15
50. . . . .	B	B	5
154. . . . .	C	C	18
155. . . . .	C	C	2

Voici, d'autre part, le moment d'apparition de la floculation dans les sérums de chevaux qui, déjà immunisés, reçoivent tous les quinze jours, à titre de dose d'entretien, une injection intraveineuse de 40 cent. cubes d'émulsion de méningocoques (faite dans les conditions que nous avons indiquées plus haut) [Voir tableau II].

B. Dans une deuxième série d'expériences, c'est *le temps de contact* qui est *fixe* et la *quantité* de sérum qui *varie*. Les sérums ont été préalablement dilués et une quantité fixe de dilution (2 cent. cubes d'une dilution au demi; 2 cent. cubes d'une dilution au tiers, etc.) est mise en présence de l'émulsion du mélange initial (antigène correspondant au sérum). On lit les résultats après un temps *fixe* et *égal* pour tous sérums (trois

TABLEAU III.

NUMÉRO DES CHEVAUX	VARIÉTÉ DE SÉRUM l'antigène correspondant au sérum	TAUX de floculation
<i>Série I. — Chevaux en cours d'immunisation.</i>		
160. . . . .	A	1/50
167. . . . .	A	1/50
161. . . . .	B	1/50
162. . . . .	B	1/50
164. . . . .	B	1/50
165. . . . .	B	1/50
163. . . . .	C	1/3
169. . . . .	C	0
<i>Série II. — Chevaux immunisés recevant des doses d'entretien.</i>		
17. . . . .	A	1/50
18. . . . .	B	1/50
54. . . . .	A	1/50
76. . . . .	A	1/10
16. . . . .	B	1/20
151. . . . .	C	1/10
50. . . . .	B	1/10
154. . . . .	C	1/2
155. . . . .	C	1/2

heures). Nous considérons comme valables les floculations qui s'étendent entre 1 et 1/50<sup>e</sup> et nous ne tenons aucun compte de celles qui se produisent au-dessus de ce taux. Nous avons, en effet, démontré que si un sérum positif *intensifie la floculation*,



un sérum négatif jouit de la remarquable propriété de *faire redevenir absolument homogène* un mélange qui flocculait spontanément. Mais une série d'essais nous a montré que le pouvoir d'homogénéisation que possède un sérum normal ou négatif vis-à-vis d'une émulsion colloïdale de notre antigène méningococcique ne dépasse pas un taux de dilution *qui est toujours supérieur* au  $1/50^e$  et qui s'étend entre  $1/60^e$  et  $1/100^e$ , suivant les origines d'antigènes. Voici les résultats obtenus avec les sérums de mêmes chevaux que ceux des expériences précédentes (tableau III).

De ces deux groupes d'expériences, retenons, pour le moment, qu'il y a des différences sensibles entre les sérums méningococciques au point de vue de la rapidité et de la puissance de leur pouvoir flocculant. L'étude de la rapidité de la flocculation est plus facile que celle du taux limite de flocculation.

### 3° COMPARAISON DE CES PHÉNOMÈNES DE FLOCCULATION AVEC L'AGGLUTINATION ET LA DÉVIATION DU COMPLÉMENT.

A. Dans un premier groupe d'expériences, nous avons, pour chacun des sérums précédents, déterminé le pouvoir agglutinant et le taux de déviation du complément (faite avec des corps microbiens). Nous donnons des résultats moyens, chaque sérum ayant été essayé avec plusieurs origines de méningocoques.

TABEAU IV. — Agglutination : chevaux en cours d'immunisation.

NUMÉRO des chevaux	VARIÉTÉ DE SÉRUM (antigène correspondant)	SAIGNÉE du 8 juillet	SAIGNÉE du 10 juillet	SAIGNÉE du 12 juillet	SAIGNÉE du 15 juillet	SAIGNÉE du 17 juillet	SAIGNÉE du 19 juillet	SAIGNÉE du 22 juillet
160	A	$1/100$	$1/50$	$1/50$	$1/150$	$1/100$	$1/100$	$1/100$
167	A	$1/100$	$1/50$	$1/50$	$1/100$	$1/100$	$1/100$	$1/100$
161	B	$1/100$	$1/50$	$1/100$	$1/200$	$1/150$	$1/100$	$1/100$
162	B	$1/100$	$1/100$	$1/100$	$1/250$	$1/100$	$1/150$	$1/100$
164	B	$1/200$	$1/50$	$1/50$	$1/100$	$1/100$	$1/100$	$1/100$
165	B	$1/200$	$1/150$	$1/100$	$1/150$	$1/200$	$1/200$	$1/200$
166	B	$1/200$	$1/150$	$1/200$	$1/100$	$1/100$	$1/200$	$1/150$
163	C	$1/200$	$1/50$	$1/100$	$1/250$	$1/100$	$1/200$	$1/200$
169	C	$1/200$	$1/150$	$1/300$	$1/200$	$1/100$	$1/150$	$1/200$

TABLEAU V. — Agglutination :  
chevaux immunisés recevant des doses d'entretien.

NUMÉRO DES CHEVAUX	VARIÉTÉ DE SÉRUM (antigène correspondant)	TAUX MOYEN d'agglutination
11. . . . .	A	1/500
78. . . . .	B	1/200
54. . . . .	A	1/200
76. . . . .	A	1/300
16. . . . .	B	1/200
151. . . . .	C	1/200
50. . . . .	B	1/200
154. . . . .	C	1/200
155. . . . .	C	1/300

TABLEAU VI. — Déviation du complément :  
chevaux en cours d'immunisation. Taux de déviation.

NUMÉRO des chevaux	SAIGNÉE du 8 juillet	SAIGNÉE du 10 juillet	SAIGNÉE du 12 juillet	SAIGNÉE du 15 juillet	SAIGNÉE du 17 juillet	SAIGNÉE du 19 juillet
160 . . .	1.000	500	200	500	200	200
167 . . .	500	200	200	500	100	200
161 . . .	500	200	200	500	100	200
162 . . .	200	200	200	500	200	1.000
164 . . .	200	200	200	500	200	200
165 . . .	200	500	200	500	200	500
166 . . .	200	200	200	500	200	200
163 . . .	200	200	200	200	200	200
169 . . .	500	200	200	200	200	200

TABLEAU VII. — Déviation du complément :  
chevaux immunisés depuis longtemps. Taux moyen.

17. . . . .	1/2.000
18. . . . .	1/1.000
54. . . . .	1/1.000
76. . . . .	1/1.000
16. . . . .	1/1.000
151. . . . .	1/1.500
50. . . . .	1/1.000
154. . . . .	1/1.500
155. . . . .	1/2.000

L'examen des tableaux qui précèdent permet de dégager quelques faits intéressants :

Tout d'abord, la floculation ne paraît pas — que l'on prenne

comme critérium la rapidité ou l'intensité de floculation — concorder au point de vue de sa valeur avec l'agglutination ou la déviation du complément.

Le tableau récapitulatif des résultats d'une saignée suivant le montre bien :

TABLEAU VIII.

NUMÉRO des chevaux	APPARITION de la floculation	TAUX de floculation	AGGLUTINATION	DÉVIATION
	K. m.			
160. . . . .	30	1/50	1/100	1.000
167. . . . .	45	1/50	1/100	500
161. . . . .	45	1/50	1/100	500
162. . . . .	45	1/50	1/100	200
164. . . . .	1	1/50	1/200	200
165. . . . .	45	1/50	1/200	200
166. . . . .	1,15	1/50	1/200	200
163. . . . .	2	1/3	1/200	200
169. . . . .	0	0	1/200	500
17. . . . .	15	1/50	1/500	1/2.000
18. . . . .	45	1/50	1/200	1/1.000
54. . . . .	1	1/50	1/200	1/1.000
76. . . . .	2	1/10	1/300	1/1.000
46. . . . .	1	1/20	1/200	1/1.000
151. . . . .	1,15	1/10	1/200	1/1.500
50. . . . .	5	1/10	1/200	1/1.000
154. . . . .	18	1/2	1/200	1/1.500
155. . . . .	2	1/2	1/300	1/2.000

Si un sérum comme le 17 flocule bien, agglutine et dévie le complément à des taux élevés, il n'y a concordance pour aucun autre sérum; le 169, en particulier, qui agglutine et dévie bien ne flocule pas.

L'étude du rythme de la floculation, pratiquée avec les sérums d'un même cheval, mais provenant de saignées successives, montre des différences avec le rythme de l'agglutination et celui de la floculation. L'examen des tableaux IV et VI montre nettement que les courbes d'agglutination et de déviation du complément concordant passent par deux maximum, correspondant au deuxième et au septième ou huitième jour pour baisser ensuite; le maximum répondant au sixième, septième ou huitième jour existe toujours. Etudions le tableau I: Nous voyons qu'il y a eu pour tous les sérums de la saignée du 12 juillet (sixième jour) un retard notable dans la floculation. Ce retard nous ayant frappés, nous avons craint la pre-

mière fois d'avoir commis une erreur de technique, mais les résultats se montrant comparables au cours d'expériences successives, nous en avons admis la valeur.

B. Les expériences précédentes ont été faites avec des sérums méningococciques qui n'avaient subi aucune préparation. Nous avons voulu savoir si les sérums saturés suivant la méthode que l'un de nous a publiée avec Dopler, c'est-à-dire des sérums que des agglutinations successives ont privés de leurs coagglutinines, conservaient leur pouvoir flocculant. Les expériences nous ont prouvé que ce pouvoir est conservé. Toutefois, la saturation enlève une partie du pouvoir flocculant (qui est encore assez net pour la pratique); il ne faut pas oublier, d'autre part, que le sérum saturé est un sérum dilué au  $1/10^e$ ; il y a intérêt à ne saturer que des sérums qui agglutinent fortement.

C. Inversement, il était intéressant de savoir si un sérum dont on aurait épuisé le pouvoir flocculant pourrait encore agglutiner des méningocoques ou dévier le complément. Les expériences ont été faites dans les conditions suivantes :

Dans un premier temps, on épuise le pouvoir flocculant d'un sérum antiméningococcique en présence du mélange de benjoin et d'extraits alcooliques de méningocoque; par exemple, un sérum méningo A est mis à flocculer pendant vingt-quatre heures avec un extrait méningo A; au bout de ce temps, on centrifuge et le liquide décanté est mis à flocculer avec un extrait B, puis avec un extrait C.

Dans un deuxième temps, le sérum dont le pouvoir de flocculation a été ainsi épuisé et qui a été soigneusement débarrassé par centrifugation des flocculats, est utilisé : 1° Pour l'agglutination en présence d'une émulsion dans l'eau physiologique de méningocoques d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose (en tous points, la technique habituelle des agglutinations). L'agglutination par le procédé rapide se fait aussitôt et très énergiquement. Par le procédé lent, l'agglutination se fait aussi très bien et le taux agglutinatif a peu ou pas baissé (cela dépend des sérums).

2° Pour la déviation du complément avec, comme antigène, des corps microbiens. La déviation est très nette, aussi nette qu'avec un sérum qui n'a pas déjà servi à la flocculation.



Il apparaît donc que *la floculation n'a enlevé du sérum ni les agglutinines ni les sensibilisatrices.*

#### 4° FILTRATION DES SÉRUMS ET POUVOIR FLOCULANT.

La préparation des sérums saturés (nous parlons ici des sérums dépouillés par l'agglutination de leurs co-agglutinines) exigeant de nombreuses manipulations qui multiplient les chances de contamination, nous avons pris l'habitude de filtrer à la bougie nos sérums saturés dès que leur préparation était terminée. Cette méthode nous avait à l'usage paru supérieure à toute autre (disons en passant que la filtration est facile puisque les sérums saturés sont des sérums dilués au 1/10<sup>e</sup>). Une question se posait : ces sérums ainsi filtrés sont-ils encore utilisables pour la floculation ? L'expérience répond par l'affirmative. La filtration du sérum méningococcique, soit ordinaire (dilué), soit saturé (filtration sur bougie Chamberland L<sup>3</sup>, pression 20 mm. quelques minutes), ne modifie par les propriétés floculantes de ces sérums.

#### 5° ESSAIS DE FLOCULATION D'AUTRES SÉRUMS EN PRÉSENCE D'EXTRAITS ALCOOLIQUES CORRESPONDANTS.

Nos essais ont échoué avec les sérums dits « antitoxiques » (diphthérique, tétanique). Nous avons essayé de préparer des antigènes alcooliques en partant soit de la toxine fraîche, soit de la toxine desséchée.

Avec des extraits alcooliques d'Eberth, de para A et B (extraits au Soxhlet), on obtient une floculation qui se produit suivant un rythme qui demandera encore une étude approfondie.

Enfin, nous avons noté une floculation très nette, en présence d'un antigène préparé par macération alcoolique d'*Amanita phalloïdes*, du sérum antiphallinique (empoisonnement par les champignons du genre *Amanita*) que l'un de nous a préparé.

## IV. — Conclusions.

Les sérums antiméningococciques sont capables de flocculer en présence d'une émulsion dans l'eau physiologique d'un mélange de teinture de benjoin et d'extrait alcoolique de méningocoques.

La réaction est très simple à réaliser ; l'addition de benjoin rend la lecture très nette, macroscopiquement, sans l'aide d'aucun appareil d'optique.

Les animaux usuels de laboratoire ne pouvant servir au titrage d'un sérum antiméningo-thérapeutique, il serait intéressant d'étudier au point de vue de leur action thérapeutique chez l'homme, les sérums qui donnent une flocculation rapide et intense.

Le méthode ne donne aucun résultat avec les sérums antitoxiques ; mais, il semble qu'elle pourrait être étendue avec avantage à certains sérums dits « antimicrobiens ».

*(Service du Dr L. Martin.)*

## L'ECTOPLASME BACTÉRIEN — LA CAPSULE

par R. LEGROUX.

Nous avons distingué dans le corps bactérien deux parties : l'endoplasme, partie médiane, véritable matière vivante et l'ectoplasme, sac de forme variable qui contient l'endoplasme (1).

La partie périphérique de l'ectoplasme n'est pas différenciée en membrane, mais elle en joue le rôle pendant la vie du microbe. L'ectoplasme superficiel plus ou moins épaissi isole et protège l'endoplasme, il permet à certaines espèces de résister mieux que d'autres aux agents de destruction. Il agit aussi à la manière d'une paroi dialysante lors des échanges qui accompagnent la vie de la bactérie : il retient, plus ou moins, suivant sa composition, les matériaux d'assimilation et de désassimilation.

Après que l'endoplasme a subi la transformation granuleuse, l'ectoplasme conserve un certain temps sa forme primitive après la disparition des granules ; puis il se résout en une masse amorphe qui peut être mise en évidence au microscope, longtemps après la disparition de la forme bactérienne première.

Certaines bactéries présentent un gonflement de l'ectoplasme, une capsule. On attache de l'importance à sa présence depuis qu'on a remarqué qu'un germe s'entoure d'une capsule pour résister, semble-t-il, à certaines influences extérieures. Une bactérie virulente pour une espèce animale l'est d'autant plus qu'elle présente une capsule et d'autant moins qu'elle en est dépourvue (bactéridie charbonneuse). Dans les cultures *in vitro*, la capsule d'une espèce bactérienne peut acquérir un volume considérable, tandis qu'elle est à peine visible dans un milieu légèrement différent : ainsi un milieu contenant des sérosités *non* coagulées favorise souvent la formation des capsules. La présence d'antiseptiques,

(1) Voir Ces *Annales*, 1920, p. 421.

acide phénique, celle de diastases produites par d'autres microbes, dans la putréfaction des viandes, ou par le microbe lui-même, en somme la présence de substance, que nous pensons nuisibles, peut provoquer l'apparition d'une capsule.

Très souvent la durée de conservation des bactéries capsulées est limitée, — huit à dix jours dans les milieux de culture habituels, — ou bien le microbe perd rapidement sa capsule et, en même temps, d'autres caractères distinctifs, bacille de Frie lländer par exemple. Parfois la division bactérienne a lieu à l'intérieur de l'ectoplasme sans que celui-ci participe à la division; la capsule contient alors 6-8 unités bactériennes et l'ensemble présente l'aspect d'un thalle mucilagineux, le microcoque tétragène capsulé en est un exemple; il perd ce caractère en deux-trois passages en milieu artificiel après son isolement.

Une bactérie mobile peut, dans certaines conditions de culture en dehors de l'organisme, ne plus présenter de cils et s'entourer alors d'un épaississement muqueux, véritable capsule qui coïncide avec l'aspect filant des cultures sur gélose, bacille du côlon [Gory] (1). Cette transformation se comprend aisément quand on s'est rendu compte de la part de l'ectoplasme dans la formation du cil: chez certaines bactéries lophotriches, *Spirillum volutans*, par exemple, où les cils sont réunis en faisceau aux extrémités du microbe, on met en évidence un prolongement de l'endoplasme qui refoule le capuchon d'ectoplasme et se divise en plusieurs cils; chaque cil est entouré d'ectoplasme, comme les doigts de la main dans un gant.

La part ectoplasmique du cil est encore mise en évidence par la persistance de la mobilité des bactéries sporulées ciliées, alors que la spore est formée et qu'il n'y a plus trace de granulations endoplasmiques dans le corps du microbe. Enfin, dans les cultures mixtes d'amibes et de bacille du côlon, l'amibe se nourrit de l'endoplasme bactérien, mais non de l'ectoplasme dont on retrouve les débris en abondance dans la culture; ces débris sont formés en partie par des amas de cils, visibles même dans les vacuoles de l'amibe et encore animés de mouvement au point qu'on les a décrits comme des spirochètes.

(1) C. R. Soc. Biologie, 1923, p. 49.



La présence d'une capsule épaisse qui empêche l'endoplasme de pousser des prolongements vers la périphérie peut expliquer la transformation d'une bactérie ciliée en bactérie immobile.

On peut se demander alors si les mouvements très accentués que présentent les cultures jeunes de certaines bactéries non ciliées, bacille dysentérique, certaines souches de bacilles capsulés, ne sont pas provoqués par une ondulation particulière de la périphérie de l'ectoplasme, ondulation provoquée par les mouvements de l'endoplasme.

Peut-on mettre facilement en évidence la capsule des bactéries par l'examen microscopique?

L'examen à l'état frais permet de voir très nettement la capsule sous certaines conditions d'éclairage : la capsule n'est pas assez réfringente pour être vue à l'éclairage direct, il est indispensable d'éclairer obliquement la bactérie et d'en éclairer une épaisseur assez grande, ce que l'on ne peut obtenir avec l'éclairage à fond noir.

Le procédé le plus pratique pour voir les capsules à l'état frais consiste à émulsionner les corps de microbes dans de l'encre de Chine, déposer une gouttelette entre lame et lamelle et examiner au moyen de l'objectif à immersion; la source lumineuse doit être assez intense et le miroir projeter obliquement le faisceau lumineux sur l'appareil Abbe; par tâtonnement, on arrive très vite à voir la capsule en faisant lentement varier le point au moyen de la vis micrométrique. L'encre de Chine à utiliser doit remplir deux conditions que l'on ne rencontre pas sous toutes les marques : les grains doivent être réguliers et la solution de gomme doit être voisine de l'isotonie aux corps bactériens.

Les méthodes de coloration sont extrêmement nombreuses, la plupart cherchent à renforcer ou à différencier les matières colorantes par adjonction d'acide phénique ou d'acide acétique. Là n'est pas le point important : la colorabilité de la capsule est liée à la fixation de la bactérie.

Si la bactérie capsulée est en suspension dans un liquide albumineux ou gommeux et que la dessiccation sur lame se fasse lentement, on peut espérer qu'en certains points de l'étalement, où l'épaisseur sera sensiblement égale à celle de la

capsule, la couche d'albumine séchera dans le même temps et maintiendra la forme de la bactérie; par ce procédé on ne peut être assuré d'avoir partout une bonne épaisseur d'albumine, de plus celle-ci se colore en même temps que la capsule sous-jacente et gêne sa visibilité.

On doit donc utiliser des traces d'albumine, mais obtenir une coagulation rapide de la capsule avant sa dessiccation. On arrive à ce résultat au moyen des vapeurs d'acide osmique.

Voici la technique que je recommande :

Sur une culture jeune de seize à dix-huit heures à 37° sur gélose inclinée d'un microbe capsulé, on prélève avec l'anse ou le fil de platine une trace de corps microbien que l'on émulsionne dans une gouttelette de liquide déposée sur une lame propre.

La gouttelette de liquide à employer est constituée par :

Sérum de mammifères . . . . .	1
Eau ordinaire . . . . .	2

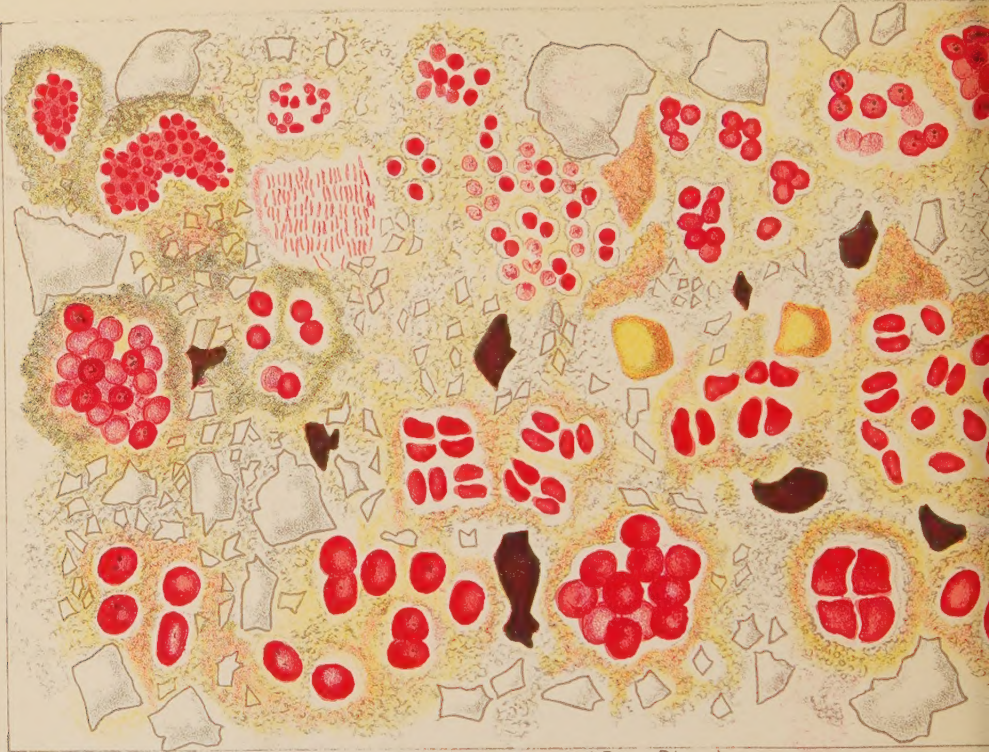
Avec l'aiguille de platine, ou l'effilure d'une pipette, on étend sur la lame la gouttelette en couche uniforme, pas trop mince et, *avant dessiccation*, on fixe par les vapeurs d'acide osmique (sol. aq. à 0 gr. 5 p. 100) pendant vingt à trente secondes; puis on laisse sécher et on verse quelques gouttes d'alcool. La coloration est obtenue avec une solution de bleu de méthylène ou de bleu de toluidine (couleurs R. A. L.) ou toute autre couleur métachromatique qui colorent différemment le corps du microbe et sa capsule. On peut aussi colorer avec une solution aqueuse de fuchsine. Dans ce cas, une simple différence de ton permet de voir la capsule. L'éosinate de bleu de toluidine, que nous avons préconisé avec J. Magrou (*loc. cit.*), colore tout l'ectoplasme en bleu pâle, l'endoplasme vivant en violet, tandis que cet endoplasme mort est coloré en rouge.

*Le Gérant : G. MASSON.*









TERRE DE RIEDSELF (Bas-Rhin)







TERRE DU TEXAS



TCHERNOZEM RUSSE

